



**Thierry Lefrançois**

***Titres et travaux scientifiques***

**Diplôme d'habilitation à diriger des recher-**

**Paris XII**

**Janvier 2001**

# Table des matières

<b>Curriculum vitae</b>	1
<b>I. Situation professionnelle</b>	1
<b>II. Etudes et diplômes</b>	1
<b>III. Activités d'enseignement</b>	2
<b>IV. Activités de recherche</b>	3
<b>V. Responsabilités administratives</b>	4
<b>Publications</b>	5
<b>I. Publications internationales dans des revues à comités de lecture</b>	5
<b>II. Revues didactiques ou professionnelles</b>	6
<b>III. Résumés publiés dans des revues internationales</b>	7
<b>IV. Communications orales et affichées</b>	7
<b>Travaux de recherche</b>	9
<b>Historique des travaux de recherche</b>	9
<b>I. Réactivité astrocytaire dans les lésions dégénératives et traumatiques du SNC</b>	9
<b>II. Caractérisation infraspécifique par les méthodes de biologie moléculaire des trypanosomes du bétail à des fins diagnostics et thérapeutiques</b>	10
<i>A. Facteurs influençant la présence de glossines transmettant les trypanosomes au bétail</i>	10
<i>B. Utilisation de la PCR pour le diagnostic de trypanosomose chez les bovins</i>	12
<i>C. Rôle de la faune sauvage dans l'épidémiologie des trypanosomoses</i>	12
<b>III. Thérapeutique expérimentale des glioblastomes</b>	13
<i>Développement de la thématique</i>	13
<i>Introduction générale</i>	14
<i>A. Greffe intracérébrale chez le rat immunodéprimé</i>	15
1- Introduction	15
2- Matériels et méthodes	15
3- Résultats	16
4- Discussion	20
<i>B. Evaluation des capacités invasives des glioblastomes dans un système de tranches cérébrales</i>	21
1- Introduction	21
2- Matériels et méthodes	22
3- Résultats	24
4- Discussion	26
<i>C. Application aux biopsies chez le Chien</i>	33
1- Biopsie par stéréotaxie assistée par TDM des tumeurs du système nerveux central chez le chien	33
2- Culture de biopsies de glioblastomes	35
<i>D. Perspectives</i>	36
1- Evolution du protocole de double injection	36
2- Modification de l'angiogénèse	37
3- Evaluation de la sensibilité chimiothérapique des glioblastomes dans les tranches cérébrales	37
4- Caractérisation génétique des cellules invasives	37

# CURRICULUM VITAE

**Thierry LEFRANÇOIS**

né le 13 décembre 1969 à Paris  
marié, 1 enfant  
28 rue Dupleix, 75015 Paris  
Tél. : 01 45 67 62 70

## I. Situation professionnelle

**Maître de Conférences de 1<sup>ère</sup> classe**

**Directeur du Laboratoire de Neurobiologie d'Alfort**

Unité Pédagogique de Physiologie-Thérapeutique

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons Alfort

Tél./ Fax : 01 43 96 70 77, email : lefrancois@vet-alfort.fr

et

INSERM U421 "Neuroplasticité et Thérapeutique"

Faculté de médecine, CHU Henri Mondor, 94010 Créteil

Tel : 01 49 81 36 82, Fax : 01 49 81 37 09, email : lefrancois@im3.inserm.fr

## II. Etudes et diplômes

**Docteur vétérinaire, docteur de l'université Paris VI**

### *Formation initiale*

- Baccalauréat, série C, mention Bien (1987).
- Classe préparatoire Lycée Marcellin Berthelot, Saint Maur, 94 (1987-1988).
- Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, optionnelle pharmacologie et recherche (1988-1992).
- Thèse de doctorat vétérinaire (1993), mention très honorable, félicitations du jury, médaille d'argent.

### *Formation universitaire*

- DEA de Biologie du Vieillessement Paris VII (1993).
- Thèse de l'université Paris VI (1996), mention très honorable avec félicitations du jury.

### *Formation complémentaire*

- Diplôme de statistiques appliquées à la recherche vétérinaire (60h, ENVA, 1992).
- Formation à l'expérimentation animale niveau 1 (80h, ENVA, 1993).
- Formation permanente INSERM "de l'immunité à l'immunopathologie" (50h, Paris 7, sept 2000)

### *Langue*

- Anglais parlé, lu, écrit couramment.
- Cours de rédaction scientifique en Anglais (40h, ENVA, 1996).

### III. Activités d'enseignement

Recruté comme Maître-Assistant des écoles vétérinaires en Juillet 1993, j'ai été titularisé Maître de Conférences en Juillet 1995 puis obtenu un avancement de classe en septembre 1999.

#### 1. Participation à l'enseignement de l'ENVA

Je suis impliqué dans les enseignements de physiologie et thérapeutique en second cycle (DCEV1, DCEV2, DCEV3).

##### • cours en amphithéâtre

Je prépare 40h des 50h de cours de DCEV1 et je dispense 20 h par an plus 20h en binôme. Cette année d'enseignement regroupe l'ensemble de la physiologie des différentes fonctions (reproduction, digestion, physiologie cardiovasculaire, respiratoire et rénale). Je suis responsable de l'organisation de l'UV reproduction et digestion.

Pour les cours, les recherches actuelles dans le domaine sont analysées, et intégrées. Les données essentielles de physiologie, qui sont nécessaires à la compréhension des mécanismes pathologiques, sont présentées à partir de résultats de travaux publiés dans les bons journaux de la spécialité. Des schémas récapitulatifs sont expliqués aux étudiants, et les régulations sont discutées à l'aide d'exemples physiologiques ou pathologiques.

Je réalise les cours de thérapeutiques (DCEV3) sur les mécanismes de l'oncogénèse.

Avec la mise en place du 3ème cycle court, je vais être chargé d'un enseignement de physiologie de la reproduction bovine (T1 Pro habilité pour 5 ans).

Dans l'avenir, je participerai aux cours de PCEV2 (Système nerveux, et mécanismes hormonaux) et étendrai ma participation aux cours de DCEV3 (thérapeutique).

##### • travaux dirigés et pratiques

Les enseignements par quart de promotion permettent une interaction entre enseignant et étudiants et autorisent le développement de points du programme en les illustrant de documents visuels (vidéo), informatiques (logiciels de simulation, logiciel d'enregistrement de données physiologiques), ou de démonstrations expérimentales. Ils sont l'occasion de faire le lien entre les sciences fondamentales et la clinique. Pour cela, les travaux dirigés sont préparés après discussion avec les cliniciens et nous intégrons les applications cliniques des données présentées. Nous mettons en évidence l'intérêt de connaître les mécanismes physiologiques pour envisager un diagnostic et une thérapeutique.

Les travaux pratiques par huitième de promotion autorisent des manipulations individuelles, en utilisant des techniques modernes d'investigation, participant à une mémorisation plus aisée, et à une jonction entre les sciences fondamentales et cliniques.

Je réalise l'ensemble des travaux dirigés et pratiques en enseignement de physiologie et thérapeutique sur toutes les années d'enseignement. Chacun de ces enseignements dure 2h et est réalisé par quart ou cinquième ou huitième de promotion : électrocardiogramme, mesure de pression artérielle, équilibres acido-basiques, urodynamique, cycles sexuels, fécondations *in vitro*, motricité utérine, motricité intestinale et gastrique, diabète, pharmacocinétique. J'ai mis au point et renouvelle régulièrement tous ces travaux dirigés et pratiques. Ils représentent 100h d'enseignement par an.

Je participe depuis 1993 à la formation "expérimentation animale niveau I" dispensée à l'ENVA à raison de 2 sessions par an (6 h) en présentant des travaux pratiques sur la manipulation des carnivores.

#### 2. Participation aux examens

• J'ai élaboré tous les sujets d'interrogation correspondant aux cours, travaux dirigés et pratiques enseignés, et corrigé les copies. J'ai choisi d'afficher les corrections à la fin de l'interrogation afin de rendre l'évaluation des étudiants formative.

• Je participe aux jurys d'examens de fin d'année depuis 1994, et je suis responsable du jury de second semestre de DCEV1 (reproduction et digestion)

#### 3. Création de documents pédagogiques

• J'ai rédigé les polycopiés illustrés sur l'appareil cardiovasculaire (70 pages), sur la reproduction (88 pages) et la digestion (65 pages).

• J'ai réalisé des polycopiés de travaux dirigés qui ont été transmis aux étudiants (15 pages environ par séance).

#### 4. Encadrement d'élèves, tutorats, stagiaires

- J'ai encadré une thèse vétérinaire dans le laboratoire de Neurobiologie d'Alfort. (J.C. Petit, : mars 2000, félicitation du jury, proposition pour un prix de thèse) et depuis cette année je suis assesseur de 2 à 3 thèses vétérinaires par an.
- Depuis 1996 je suis tuteur de stages de DCEV2 réalisés dans des laboratoires de recherche (INRA, institut Pasteur, INSERM, hôpitaux de Paris, universités américaines) (3 par an en moyenne).

#### 5. Enseignements divers

Depuis 1994, j'ai participé de façon variable selon les années à des formations extérieures :

- Formation générale de délégués vétérinaires (Pfizer)
- Formation générale de délégués médicaux (Sup Santé)
- Formation en physiologie d'infirmières vétérinaires (Institut Bonaparte)
- Formation de vétérinaires, ingénieurs et techniciens aux techniques de biologie moléculaire au CIRDES (Burkina Faso)

## IV. Activités de recherche

#### 1. Cadre structurel, position personnelle

##### • 1992

Stages de fin d'étude à l'INSERM U282 CHU Henri Mondor, Créteil.

Ce stage a été réalisé dans le cadre de l'optionnelle pharmacologie et recherche biomédicale. D'une durée de 7 mois, ce stage m'a permis de m'intégrer dans une structure de recherche et d'y participer pleinement.

##### • 1992-1993

DEA de biologie du vieillissement. Stage de DEA dans l'unité Inserm 282 "Hormones et différenciation cellulaire", CHU Henri Mondor, Créteil, en collaboration avec l'UP de pathologie du bétail et de physiologie de l'ENVA

Implication de l'astrocyte dans les encéphalopathies spongiformes.

Etude de la tremblante naturelle du mouton ou scrapie.

##### • 1993-1996

Unité INSERM 421 "Neuroplasticité et Thérapeutique", CHU Henri Mondor, Créteil, Directeur Marc Peschanski. Thèse d'université.

Membre permanent du conseil de laboratoire. Groupe de recherche interaction neurone-glie.

Réactivité astrocytaire et conséquence sur la régénération neuronale. Etude *in vitro* d'un modèle de lésion du SNC. Modulation de la réactivité astrocytaire par une stratégie antisens.

##### • 1996-1997

CSN post-doctorat CIRAD-EMVT au CIRDES (centre international de recherche-développement en zone subhumide, Bobo Dioulasso, Burkina Faso). Caractérisation infraspécifique par les méthodes de biologie moléculaire des trypanosomes du bétail à des fins diagnostics et thérapeutiques.

##### • depuis 1998

Directeur du laboratoire de neurobiologie d'Alfort créé suite à un appel d'offre de la Direction Générale de l'Enseignement de la Recherche. "Modélisation thérapeutique en neurologie"

Responsable de l'équipe "Recherches thérapeutiques sur le glioblastome" dans l'unité INSERM 421 (M. Peschanski), .

Mise au point de modèles *in vitro* et *in vivo* de glioblastome. Etude des voies de migration des cellules tumorales. Interactions hôte-cellules tumorales

#### 2. Compétences techniques en recherche

##### **Biochimie et immunologie**

- Extraction des protéines, " western blotting ", ELISA.
- Marquages immunohistologiques, immunomarquages fluorescents et analyse au microscope con-

focale.

- Immunosuppression lors de greffes.

### **Biologie moléculaire**

- Extraction d'ADN, PCR, emploi des puces à ADN (atelier de formation INSERM).
- Extraction d'ARN, " northern blotting ", hybridation *in situ*, transcription *in vitro*, traduction *in vitro*.
- Utilisation d'ARN antisens.

### **Culture cellulaire**

- Cultures primaires d'astrocytes et de neurones, cocultures, cultures de lignées et de biopsies.
- Cultures organotypiques de tranches de cerveaux.

### **Histologie**

- Coupes histologiques (microtome, ultramicrotome, cryostat).
- Colorations et marquages.

### **Conduite des expérimentations**

- Autorisation d'expérimenter sur animaux vivants, niveau 1 responsable d'expérimentations.
- Stage INSERM Hygiène et Sécurité.

## **3. Encadrement de la recherche**

J'ai encadré Sophie De Boüard inscrite au DEA Cellule Normale et Pathologique (Paris V) au cours de l'année 1998-1999. Elle a reçu la mention Très Bien, a été Major de promotion et s'est vue attribuer, une bourse MRE pour ces travaux dans mon groupe de recherche sur les glioblastomes. J'encadre actuellement sa thèse sur les voies de migration des gliomes.

J'ai encadré en 2000 une étudiante titulaire d'une maîtrise sur un stage long (6 mois) dans mon groupe sur la thérapeutique antiproliférative des glioblastomes.

Je dirige les recherches de ces étudiants, les encadre d'un point de vue technique et scientifique, et les forme en particulier à la rédaction d'articles.

Dans mon groupe, Jean-Sébastien Guillamo réalise une thèse sur l'utilisation de molécules thérapeutiques dans un modèle *in vitro* de glioblastome. Christo Christov est en poste vert INSERM et développe un modèle d'étude des glioblastomes issus de biopsies.

J'ai encadré une thèse de doctorat vétérinaire au sein du laboratoire de neurobiologie sur les thématiques du laboratoire : Jean-Claude PETIT (Mars 2000) "Réactivité astrocytaire et régénération neuronale"

## **4. Participation à des sociétés savantes**

- Membre de la société française de Neurosciences depuis 1993.
- Membre de l'EANO (European association of Neurooncology) depuis 1998.
- Membre correspondant de AACR (American association for cancer research) depuis Janvier 2000.

## **V. Responsabilités administratives**

### **1. Responsabilités et fonctions au service de l'école vétérinaire**

- Responsable du Laboratoire de Neurobiologie d'Alfort
- Représentant de l'école vétérinaire pour le projet Physiopôle à Créteil
- Membre du conseil du département des sciences biologiques et pharmaceutiques (DSBP), du conseil de discipline, et de la commission communication.
- Membre des jurys de titularisation de Maître de Conférences, et d'attribution des prix de Thèse

### **2. Responsabilités et fonctions au service de l'INSERM**

- Responsable de l'équipe "Recherches thérapeutiques sur le glioblastome"
- Expert de l'INSERM pour les appels d'offres actions concertées du vivant sur les encéphalopathies spongiformes (1995).
- Correspondant informatique de l'unité 421

## PUBLICATIONS

L'ensemble des travaux de recherche a donné lieu à :

10 publications dans des revues internationales à comité de lecture dont 4 en premier auteur.

4 publications soumises dont 3 en dernier auteur.

4 publications dans des revues plus professionnelles ou à des fins de vulgarisation de bonne qualité en premier ou dernier auteur.

5 publications d'abstracts.

21 communications à des congrès internationaux (9 en 1er auteur).

Table 1. Publications d'articles dans des revues internationales à comité de lecture et facteurs d'impact (ISI, 1997) des périodiques.

Année	Journal	Facteur impact	Place auteur
2000	Neuroreport	2.5	troisième
1999	Acta Tropica	1.4	premier
	Mem Inst Oswaldo Cruz	0.4	cinquième
	Veterinary Parasitology	1.1	troisième
1998	Molecular Ecology	2.8	premier
	Annals of NY Academic of Sciences	1.0	deuxième
1997	The Journal of Neuroscience	8.0	premier
1995	Neuroreport	2.5	deuxième
	Neurochemical Research	1.3	quatrième
1994	Microbial Pathogenesis	1.8	premier

### I. Publications internationales dans des revues à comités

#### Publications soumises en 2000

1. de Boüard S, Kassar-Duchossoy L, Guillamo J-S, Christov C, Masset M, Cohen-Haguenauer O, Peschanski M, **Lefrançois T**.

Characterization of diffusely invasive human glioma cells following implantation into brain slices *in vitro*.

2. Guillamo J-S, Lisovoski F, Leguerinel C, Defer G, Christov C, Peschanski M, **Lefrançois T**.

Migration pathways of human glioblastoma cells implanted into the immunosuppressed rat brain.

3. Moissonnier P, Blot S, Devauchelle P, Deslile F, Beuvon F, Boulouha L, Colle M-A, **Lefrançois T**.

Stereotactic CT-guided brain biopsy in the Dog. Cytological and histological diagnosis and early complication in 23 dogs (1996-1999).

4. Bauer B, Kabore I, **Lefrançois T**, Solano P.

Impact of Triflumuron impregnated targets on two tsetse populations (*Glossina morsitans submorsitans* Newstead and *G. tachinoides* Westwood) in the game ranch of Nazinga, southern Burkina Faso.

#### 2000

5. Chambaut-Guerin A-M, Costa SL, **Lefrançois T**, Fages C, Gautherreau X, Tardy M (2000). Effect of retinoic acid and tumor necrosis factor alpha on GL-15 glioblastoma cells.

*Neuroreport*, 11, 389-393.

#### 1999

6. **Lefrançois T**, Solano P, Bauer B, Kabore I, Touré SM, Cuny G, Duvallet G. (1999). Polymerase Chain Reaction characterization of trypanosomes in *Glossina morsitans submorsitans* and *G. tachinoides* collected on the game ranch of Nazinga, Burkina Faso.

*Acta Tropica*, 72, 65-77.



7. Solano P, Michel J-F, **Lefrançois T**, de La Rocque S, Sidibé I, Zoungrana A, Cuisance D (1999). PCR as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Veterinary Parasitology*, 86, 95-103.

8. Duvallet G, de La Rocque S, Reifenberg J-M, Solano P, **Lefrançois T**, Michel J-F, Bengaly Z, Sidibe I, Cuisance D, Cuny G, (1999). Review on the molecular tools for the understanding of the epidemiology of animal trypanosomosis in west Africa. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94, 245-248.

## **1998**

9. **Lefrançois T**, Solano P, de La Rocque S, Bengaly Z, Reifenberg J-M, Kabore I, Cuisance D. (1998). New epidemiological features on Animal Trypanosomosis by molecular analysis in the pastoral zone of Sideradougou, Burkina Faso. *Molecular Ecology*, 7, 897-904.

10. de La Rocque S, **Lefrançois T**, Reifenberg J-M, Solano P, Bengaly Z, Kabore I, Cuisance D. (1998). PCR analysis and spatial repartition of trypanosomoses infecting tsetse flies in Sideradougou area of Burkina Faso. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849, 32-38.

## **1997**

11. **Lefrançois T**, Fages C, Peschanski M, Tardy M (1997). Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense GFAP mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *The Journal of Neuroscience*, 17, 4121-4128.

## **1995**

12. Mouchel Y, **Lefrançois T**, Fages C, Tardy M (1995). Apo E gene expression in astrocytes. Developmental pattern and regulation. *Neuroreport*, 7, 205-208.

13. Le Prince G, Delaere P, Fages C, **Lefrançois T**, Touret M, Salanon M, Tardy M (1995). Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of Alzheimer type. *Neurochemical Research*, 20, 859-862.

## **1994**

14. **Lefrançois T**, Fages C, Brugère-Picoux J, Tardy M (1994). Astroglial reactivity in natural scrapie of the sheep. *Microbial Pathogenesis*, 17, 283-289.

## **II. Revues didactiques ou professionnelles**

15. Moissonnier P, Bordeau W, Devauchelle P, Delisle F, Blot S, **Lefrançois T** (1999). La biopsie des tumeurs de l'encéphale par stéréotaxie assistée par densitométrie : mise au point d'un nouveau cadre et premières applications cliniques chez le chien. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France*, 72, 107-112.

16. Moissonnier P, Duchossoy Y, **Lefrançois T** (1996). Problèmes immunitaires soulevés par les greffes dans le SNC. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 172, 181-191.

17. **Lefrançois T**, Tardy M (1995). L'astrocyte, une cellule clé dans la pathogénie des encéphalopathies spongiformes. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 1, 29-32.

18. **Lefrançois T**, Le Prince G, et Tardy M (1994). Démences de type Alzheimer et encéphalopathies spongiformes, analogies et théories nouvelles. *Médecine Sciences*, 10, 1141-1143.



### III. Résumés publiés dans des revues internationales

Guillamo J-S, Lisovoski F, **Lefrançois T**, Tardy M, Peschanski M. GL15 human glioblastoma cells implanted into the rat brain: a model to study tumor cell migration. *Journal of Neuro-Oncology*, 1998, Vol. 39, No 2, pp 115

Mouchel Y, **Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense GFAP-mRNA in injured neuron-astrocyte coculture. *J. Neurochem*, 1997, 69 (Suppl.), S243.

Tardy M, Fages C, **Lefrançois T**. Inhibition of GFAP expression supports the requirement of GFAP in some aspects of phenotypic and metabolic differentiation of astroglial cells *in vitro*. *J. Neurochem*, 1995, 65 (Suppl.), S119A.

Tardy M, **Lefrançois T**, Fages C, Le Prince G. GFAP gene expression during postnatal development. *Cell Biology International*, 1994, 18 (5), We 152.

**Lefrançois T**, Fages C, Brugère-Picoux J, Tardy M. Astrocyte plasticity in natural scrapie of the sheep. *Facts and Research in Gerontology*, 1994, 8, 72.

### IV. Communications orales et affichées

#### 2000

**Lefrançois T**, Guillamo J-S, de Boüard S, Kassar-Duchossoy L, Christov C, Tardy M, Peschanski M. Grafted glioblastoma cells target preexisting infiltrated tumor cells and can be used as vector for therapeutics. Annual congress of American Association for Cancer Research, San Francisco, May 2000.

de Boüard S, Kassar-Duchossoy L, Guillamo J-S, Christov C, Tardy M, Peschanski M, **Lefrançois T**. Human glioblastoma cell line grafted into brain slice culture reproduced *in vivo* infiltration and migration patterns. Annual congress of American Association for Cancer Research, San Francisco, May 2000.

Solano P, de La Rocque S, Cuisance D, **Lefrançois T**, Michel JF, Cuny G, Duvallet G Apport des données moléculaires dans la prévention spatiale du risque trypanosomien. Congrès de la société française de parasitologie, Montpellier, 1-3 mars 2000.

#### 1999

Moissonnier P, Bordeau W, Devauchelle P, Delisle F, Blot S, **Lefrançois T**. CT-Guided stereotaxic biopsy of intracranial lesions : accuracy testing of a new device and clinical applications in 8 dogs. Congrès Mondial Vétérinaire WAVSA, Lyon, 23-26 Septembre 1999.

#### 1998

Guillamo J-S, Lisovoski F, **Lefrançois T**, Tardy M, Peschanski M. GL15 human glioblastoma cells implanted into the rat brain: a model to study tumor cell migration. Third congress of the European Association for Neuro-Oncology, Versailles, 13-16 Septembre 1998.

#### 1997

Bengaly Z, **Lefrançois T**. Apport de l'application de la PCR dans l'épidémiologie des trypanosomoses animales africaines. 3ème Journées de la Société Burkinabé de Parasitologie (SOBEPAR), 13-14 Juillet 1997.

Bauer B, Kabore I, **Lefrançois T**, Solano P. Impact of the chitin synthesis inhibitor Triflumuron in two tsetse species in the subhumid zone of Burkina Faso. Poster. 24ème réunion du Conseil Scientifique International pour la Recherche et la Lutte contre les Trypanosomiasés, Maputo (Mozambique), 29 septembre - 3 octobre 1997.

Duvallet G, Reifenberg JM, Solano P, Sidibé I, de La Rocque S, **Lefrançois T**, Cuisance D, Touré SM, Cuny G. Epidémiologie moléculaire des trypanosomoses animales: premier bilan des recherches menées en Afrique de l'Ouest. Communication orale. 24ème réunion du Conseil Scientifique International pour la Recherche et la Lutte contre les Trypanosomiasés, Maputo (Mozambique), 29 septembre - 3 octobre 1997.

Mouchel Y, **Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense GFAP-mRNA in injured neuron-astrocyte coculture. Joint Sixteenth Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and Twenty-eighth Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, Boston, USA, July 20-26, 1997.

## 1996

**Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. An inhibition of astroglial reactivity by antisense GFAP-mRNA promote neuronal migration and neuritic growth . An *in vitro* study. 2nd European Meeting on glial cell function and disease, Arcachon, 21-25 Avril 1996.

**Lefrançois T**, Fages C, Brugère-Picoux J, Tardy M. Astrocyte as the key cell in the pathogenesis of spongiform encephalopathy. IIIrd international symposium on transmissible subacute spongiform encephalopathies : prion diseases, Paris, 18-20 Mars 1996

## 1995

**Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. Une inhibition partielle de la GFAP par un ARN antisens, entraîne des changements phénotypiques et métaboliques dans l'astrocyte en culture. 2ème Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18 Mai 1995.

**Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. Partial inhibition of Glial Fibrillary Acidic Protein expression by an antisense mRNA induces regression of morphologically differentiated astrocytes. Communication orale. International Symposium on axonal regrowth in the mammalian spinal cord and peripheral nerve, Deauville, 27-29 Avril 1995

Tardy M, Fages C, **Lefrançois T**. Inhibition of GFAP expression supports the requirement of GFAP in some aspects of phenotypic and metabolic differentiation of astroglial cells *in vitro*. 15th International Society for Neurochemistry biennial meeting, Kyoto, Japon, 2-7 Juillet 1995.

## 1994

**Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. Une inhibition partielle de l'expression de la GFAP par un ARN antisense induit une forte regression des prolongements astrocytaires. Communication orale. Club des cellules gliales, Paris, 10 décembre 1994.

**Lefrançois T**, Fages C, Tardy M. Un ARNm GFAP antisens induit des changements structuraux dans une lignée cellulaire d'astrocytome humain. Communication orale. Club français du cytosquelette, Banyuls, 2 - 4 juin 1994.

Fages C, Rolland B, LePrince G, Riol H, **Lefrançois T**, Arcuri C, Tardy M. GFAP gene expression during postnatal development. First european meeting on glial cell function in health and disease, Heidelberg, March 24-27, 1994.

**Lefrançois T**, Fages C, Brugère-Picoux J, Tardy M. Astrocytic plasticity in natural scrapie of the sheep. First european meeting on glial cell function in health and disease, Heidelberg, March 24-27, 1994.

Tardy M, **Lefrançois T**, Fages C, Le Prince G. GFAP gene expression during postnatal development. 4th European Congress of Cell Biology, Prague, June 26th - July 1st 1994.

## 1993

Tardy M, **Lefrançois T**, Fages C, Brugère-Picoux J. Etude de la plasticité astrocytaire dans la tremblante du mouton. Communication orale. Club des cellules gliales, Bordeaux, 1er octobre 1993.

**Lefrançois T**, Fages C, Brugère-Picoux J, Tardy M. Astrocyte plasticity in Scrapie as a model of Alzheimer pathogenesis. Congrès IPSEN, "Les précurseurs de la protéine amyloïde dans le développement, le vieillissement et la maladie d'Alzheimer", Lyon, 21 Juin 1993.

## Historique des travaux de recherche

J'ai choisi de travailler en recherche dans le domaine des Neurosciences pendant mes études vétérinaires. J'ai donc préparé en 3<sup>ème</sup> année de l'école ma thèse sur les encéphalopathies spongiformes. Désirant apporter un volet expérimental à ma thèse, j'ai réalisé un stage de fin d'étude (7 mois) à l'INSERM U282 (Créteil) sur la réactivité astrocytaire dans la tremblante du mouton. J'ai poursuivi sur le même sujet et dans la même unité sous la direction de Marcienne Tardy par un DEA de biologie du vieillissement. Ma thèse d'université dans l'U421 de l'INSERM dirigée par Marc Peschanski a représenté la suite de ces travaux en élargissant la thématique à la réactivité astrocytaire associée aux lésions traumatiques du système nerveux central (SNC). Ces travaux ont notamment abouti à un article paru dans *The Journal of Neuroscience*. De septembre 1996 à décembre 1997, j'ai tiré profit du service national pour réaliser un post doctorat en tant que coopérant du CIRAD-EMVT (en collaboration avec l'ORSTOM) au CIRDES (centre international de recherche-développement en zone sub-humide, Bobo Dioulasso, Burkina Faso). Ce poste s'il ne correspondait pas d'un point de vue thématique à mes travaux en Neurosciences, avait l'avantage d'utiliser mes compétences en biologie moléculaire, et de développer un travail original d'un point de vue technique et scientifique. Il m'a aussi permis d'apprendre à encadrer des techniciens, des chercheurs et des étudiants (thèses vétérinaires et de pharmacie). De retour

en France, j'ai pris la responsabilité du laboratoire de Neurobiologie d'Alfort de l'ENVA, et j'ai choisi de développer un travail commun avec l'U421 de l'INSERM. J'ai ainsi été chargé début 1998 de monter un groupe dans cette unité pour développer des recherches thérapeutiques sur les glioblastomes. J'ai obtenu sur mon projet scientifique un financement de la Ligue contre le cancer et de l'ARC. D'abord seul sur ce projet (pendant 9 mois), j'ai ensuite encadré une étudiante dans le DEA *Cellule normale et pathologique* qui a continué par une thèse, puis j'ai pu recruter une technicienne grâce au financement de l'ARC. Le groupe a été étoffé en 1999 par l'arrivée d'un praticien hospitalier, d'un poste vert INSERM, d'un interne en médecine qui poursuit par une thèse d'Université et d'une étudiante titulaire d'une maîtrise. En 1999, un nouveau financement de l'ARC nous a permis d'investir dans du gros matériel (analyse d'image sur microscope à fluorescence). Ce travail constitue une véritable collaboration que j'orchestre avec l'ENVA. Les travaux plus fondamentaux de recherche des voies de migration sur modèles *in vitro* et *in vivo* de glioblastome se déroulent à l'INSERM en utilisant des lignées tumorales mais aussi des tumeurs issues de biopsies de glioblastome humain (CHU Henri Mondor) et canin (ENVA). L'application clinique prévue sur le chien présentant un gliome spontané prendra place à l'école vétérinaire avec les membres du laboratoire de Neurobiologie.

## I. Réactivité astrocytaire dans les lésions dégénératives

Cette partie correspondant à mon travail de thèse, seul le résumé sera présenté dans ce rapport : Parmi les nombreuses fonctions attribuées à l'astrocyte, le maintien de l'homéostasie cérébrale nécessite des interactions complexes avec les neurones. Dans le SNC lésé, la réactivité astrocytaire consécutive, peut certes constituer un obstacle à la régénération neuronale, mais aussi une source de facteurs favorisant la récupération neuronale. Nous avons exploré le rôle de l'astrocyte comme cellule immunocompétente et son impli-

cation dans le transport lipidique nécessaire à la régénération membranaire. Nous avons caractérisé la réactivité astrocytaire dans deux maladies neurodégénératives, et élaboré un modèle *in vitro* de lésion traumatique afin d'analyser le rôle de la réactivité astrocytaire dans la régénération axonale.

Nous avons montré que l'astrocyte, *in vitro*, est une cible pour le TNF $\alpha$ , et possède les deux types de récepteurs pour cette cytokine. Le TNF $\alpha$  induit une chute du taux de GFAP associée à une

disparition des prolongements astrocytaires. L'astrocyte exprime de façon constitutive les transcripts du TGF $\beta$ , une cytokine anti-inflammatoire ; sa régulation développementale est similaire à celle de la GFAP. L'expression par l'astrocyte du gène de l'apolipoprotéine E montre que cette cellule peut participer à l'apport de cholestérol aux membranes, et aux cônes de croissance. Ces trois molécules, le TNF $\alpha$ , le TGF $\beta$  et l'apoE, sont surexprimées lors de lésion du SNC, et pourraient participer aux processus inflammatoires et à la réparation neuronale. Nous avons observé dans la tremblante naturelle du mouton une réactivité astrocytaire précoce avant toute lésion neuronale, présente uniquement dans certaines zones cérébrales. Cette réactivité se traduit par une surexpression génique de la GFAP - protéine de structure -, et de la glutamine synthétase - enzyme de détoxification-. Dans la démence de type Alzheimer, nous avons détecté une chute du taux de glutamine synthé-

tase reflétant une atteinte cellulaire probablement oxydative, qui pourrait concourir à une aggravation des lésions neuronales par excitotoxicité. Enfin, des cocultures neurones-astrocytes lésées physiquement reproduisent un traumatisme cérébral avec l'apparition d'astrocytes réactifs sur les bords de la lésion qui empêchent la croissance neuritique. La GFAP, protéine majoritaire des gliofilaments, est surexprimée parallèlement à l'hypertrophie astrocytaire. En diminuant par transfection d'ARN antisens la synthèse de GFAP, nous avons fait régresser les prolongements astrocytaires et nous avons permis la croissance neuritique, et la migration neuronale dans les lésions, ainsi qu'une régénération axonale illustrée par l'augmentation du taux de protéine GAP-43. Des changements dans la réactivité astrocytaire, induits par une inhibition de la synthèse de GFAP, ont conduit à des modifications d'environnement favorables à la régénération axonale.

## II. Caractérisation infraspécifique par les méthodes de bio-

Cette partie correspond à mon post-doctorat au CIRDES (Burkina-Faso). Le sujet ne correspondant pas aux Neurosciences sur lesquels se fondent mes travaux actuels, je présenterai simplement les principaux résultats obtenus. Une idée plus précise du travail effectué pourra être obtenue par la lecture des articles correspondant.

Les trypanosomoses africaines sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma*, dont la transmission par injection à l'hôte définitif (homme et bétail en particulier) est réalisée par un insecte hématophage généralement vecteur biologique tel que les glossines ou mouche tsé-tsé. En santé humaine, les trypanosomoses demeurent une maladie d'actualité puisque 300 à 500000 cas sont estimés par l'OMS avec une résurgence ces dernières années en Afrique centrale. La trypanosomose animale représente une contrainte majeure de l'élevage en Afrique sub-saharienne et est considérée comme la pathologie à vecteur la plus importante chez les bovins. Cette pathologie conduirait selon la FAO à des pertes économiques de 1 milliard de Dollars par an et à une réduction de l'élevage de 7 millions de km<sup>2</sup>. Le marché des trypanocides représente 44% des ventes de médicaments vétérinaires. Des méthodes de contrôle non polluantes peuvent montrer leur efficacité, pourtant elles nécessitent une parfaite connaissance de la situation épidémiologique (Bauer *et al*, 1995). De plus il existe un manque flagrant de connaissances sur le diagnostic de la maladie, la caractérisation des agents pathogènes et la relation complexe entre les parasites, les vecteurs et les hôtes. Les techniques par-

asitologiques classiques présentent des limites de sensibilité chez le vecteur et l'hôte, et de spécificité du fait du diagnostic basé uniquement sur la localisation des trypanosomes dans les organes des glossines. La technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) est reconnue actuellement comme la technique la plus sensible et spécifique pour l'identification des trypanosomes (Masiga *et al*, 1992). Nous avons donc utilisé cette technique principalement dans le cadre de deux études au Burkina Faso. La première est une étude multidisciplinaire dans la zone agro-pastorale de Sidéradougou, visant à déterminer les facteurs influençant la présence de glossines transmettant les trypanosomes au bétail et à utiliser cette technique pour évaluer le risque trypanosomien. La seconde concerne le rôle potentiel de la faune sauvage en tant que réservoir de la trypanosomose du bétail.

### A. Facteurs influençant la présence de glossines transmettant les trypanosomes au bétail

Cette étude s'intégrait dans un travail multidisciplinaire visant à identifier les facteurs prépondérants déterminant la présence de glossines transmettant les trypanosomes au bétail (De la Rocque et Cuisance, 1997). Des données aussi diverses que les résultats entomologiques et parasitologiques, la description du réseau hydrographique, de la pression humaine, de l'élevage, du climat ou de la végétation ont été récoltées, et référencées géographiquement. Notre travail a consisté en la caractérisation par PCR des try-



panosomes infectant le bétail et transmis par les glossines (*Glossina tachinoides* et *G. palpalis gambiensis*). Les échantillons analysés proviennent des captures réalisées en 1996-97. 1026 pièges ont été posés et 3604 glossines capturées dont 1802 ont pu être analysées. 298 glossines infectées et 107 bovins ont été analysés par PCR. Une analyse de l'origine des repas de sang des glossines a été conduite parallèlement.

La comparaison parasitologie-PCR a montré que 45.5% des infections présumées être des infections à *Nannomonas* par la localisation des parasites, n'en étaient pas en PCR. Ces infections étaient en fait des infections à *T. vivax* dans le proboscis associées à une autre infection dans l'intestin, ou des infections à *T. brucei*, ou enfin des infections non identifiées.

L'utilisation en PCR d'amorces distinctes pour *T. congolense* et *T. simiae* a permis de distinguer ces deux espèces de *Nannomonas*. Nous avons ainsi montré que *T. simiae* était absent de la zone. Nous avons pu aussi distinguer les formes savane et forêt de *T. congolense* qui peuvent avoir des pathogénicités différentes et des spécificité d'hôtes, et diagnostiquer des infections mixtes (Reifenberg *et al*, 1997) (Table 2).

	<i>tachinoides</i>	<i>gambiensis</i>
identifiés	63.8% ***	28.9%
<i>T.c. savannah type</i>	20.3% **	8.3%
<i>T.c. riverine-forest type</i>	7.9%	4.1%
<i>T. vivax</i>	46.9% ***	18.2%
<i>T. brucei</i>	9.6% *	2.5%

Table 2. Résultats de la PCR sur les glossines infectées. Les \* indiquent des différences significatives \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. La somme des pourcentages indiqués entre parenthèses est supérieure au pourcentage d'identifiées en raison des infections mixtes.

Chez les bovins, la PCR sur le buffy-coat a permis d'identifier 90% des infections observées au microscope et elle a détecté une infection chez 50% des animaux non infectés à l'analyse parasitologique, mais présentant un hématoците inférieur à 25. Ces résultats démontrent la puissance de l'utilisation de cette technique par rapport à la technique parasitologique.

Alors que chez les glossines *T. vivax* était présent en majorité, les bovins étaient principalement infectés par *T. congolense* (Table 3). Ces résultats suggèrent soit une possible sélection des glossines lors de la capture, soit un contrôle par les bovins de la région de l'infection à *T. vivax*. Alternativement on peut imputer cette différence à un défaut de détection de *T. vivax* chez les bovins (primers utilisés, extraction d'ADN)

	Glossines	Bovins
identified by PCR	124	107
<i>T.c. savannah type</i>	21.8% ***	63.3%
<i>T.c. riverine forest type</i>	9.7% *	3.1%
<i>T. vivax</i>	83.9% ***	39.8%
<i>T. brucei</i>	9.7%	11.2%
mixed	20.2%	16.3%

Table 3. Analyse PCR des infections des glossines et des bovins.

Les \* indiquent des différences significatives \*p<0.05, \*\*\*p<0.001. Les deux espèces de glossines sont cumulées. La somme des pourcentages indiqués entre parenthèses est supérieure à 100 en raison des infections mixtes.

Pour la première fois, *T. congolense* de type forêt a été identifié par PCR sur des bovins lors d'une enquête. Cependant sa proportion est restée très inférieure chez les bovins par rapport aux glossines suggérant une différence dans les capacités de transmission.

Des différences significatives ont été observées entre la partie Est et Ouest de la zone pourtant séparées que de quelques km (Table 4). La partie Ouest a présenté un fort taux d'infection des glossines, des repas de sang pris préférentiellement sur reptiles et de nombreuses infections immatures non identifiées en PCR donc attribuées à *T. grayi*. Dans cette zone, la densité de glossines porteuses de trypanosomes reconnus pathogènes était de 2,58 individu par km de réseau hydrographique. Dans la partie Est, si les glossines étaient moins nombreuses, les repas de sang étaient pris majoritairement sur bovins et les infections identifiées comme étant dues à des trypanosomes pathogènes. Dans cette zone, la densité de glossines porteuses de trypanosomes pathogènes était de 6,91 individu par km.

	Ouest	Est
Infections de l'intestin	65.5% ***	20.0%
non identifiées	66.5% ***	15.8%
Repas sur reptile	36.4% **	16.9%
infections du proboscis	22.7% ***	64.2%
<i>T. vivax</i>	21.2% ***	65.3%
Repas sur ruminant	21.2% **	42.8%

Table 4. Différences d'infection et de repas de sang entre les zones Ouest et Est.

Les \* indiquent des différences significatives \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

Parallèlement des études de génétique des populations de glossines à l'aide de marqueurs microsatellites ont démontré une structuration génétique de l'espèce *Palpalis gambiensis*. Entre les deux zones, les échanges entre individus étaient très limités. Cette analyse met en évidence à la fois l'utilité de la PCR pour le diagnostic et la nécessité d'aborder l'analyse du risque trypanosomien de façon coordonnée et spatiale. La superposition de toutes les données (cours d'eau, végétation, bétail, présence humaine) a permis d'établir des zones de risque. De manière très intéressante, ces différentes zones ont pu être parfaitement corrélées à la densité de glossines porteuses de trypanosomes pathogènes identifiés par PCR alors qu'aucune corrélation n'avait pu être démontrée avec l'analyse parasitologique.

### B. Utilisation de la PCR pour le diagnostic de trypanosomose chez les bovins

Pour les études épidémiologiques et pour entreprendre la lutte anti-vectorielle de la trypanosomose, une évaluation rapide peu coûteuse et fiable de la prévalence est nécessaire. Dans la même zone de Sidéradougou, nous avons appliqué la technique PCR et comparé les résultats à ceux obtenus par l'étude parasitologique. Un échantillon représentatif de 1036 bovins a été prélevé assurant un calcul de prévalence avec une erreur de 6 %. Sur cet échantillon, 260 prélèvements ont aussi été analysés en PCR.

La prévalence calculée après analyse PCR (11,5%) s'est révélée statistiquement supérieure à celle obtenue par l'analyse parasitologique (4,2%). Seul un cas détecté en parasitologie n'a pas pu être identifié par PCR. La PCR constitue donc un test plus sensible pour évaluer la prévalence chez les bovins, alors que jusqu'à présent elle avait été utilisée essentiellement pour la détection chez les glossines. Une telle différence de prévalence peut avoir des conséquences non négligeable sur le choix de la stratégie de lutte. Cette technique nous a de plus permis d'identifier une plus forte proportion de *T. congolense* et *T. brucei*, trypanosomes fortement pathogènes pour les bovins, les derniers pouvant présenter un risque pour l'homme.

Le protocole utilisé lors de cette enquête a été simplifié au maximum pour réduire la technicité, le temps de manipulation (3 semaines d'analyse pour 1 personne), et le coût (0,5 Dollar par animal) rendant la technique réalisable en routine dans un laboratoire équipé.

### C. Rôle de la faune sauvage dans l'épidémiologie des trypanosomoses

Cette étude a eu pour but de rechercher le rôle potentiel de la faune sauvage comme réservoir pour la trypanosomose du bétail. Le ranch de

Nazinga se situe à proximité de la zone agro-pastorale de Yalé où une lutte contre les glossines a été entreprise depuis 1994. Lors des missions en 1996-97, 4631 *G. morsitans submorsitans* ou *G. tachinoides* ont été capturées le long de la Sissili et de la route principale du ranch. Parmi les 435 glossines disséquées, 166 étaient infectées. L'ensemble des organes des glossines infectées, a été analysé par PCR.

Une densité apparente de glossine très élevée, un taux d'infection très élevé dans les deux espèces, une identification de nombreux repas de sang sur faune sauvage et une caractérisation de trypanosomes pathogènes pour les bovins ont mis en évidence un risque trypanosomien très élevé dans cette zone.

La PCR a permis d'identifier les espèces *T. congolense* et *T. simiae* aux sein des *Nannomonas*, de différencier les formes savane et forêt de *T. congolense* qui peuvent avoir des différences d'hôte définitif (Reifenberg *et al*, 1997), et d'identifier des infections mixtes (Table 5). De plus 13% des organes considérés comme négatifs en parasitologie, se sont révélés être infectés à l'analyse PCR. Cette analyse précise donc le risque pathogène pour les bovins présents dans la zone.

	<i>G. morsitans submorsitans</i>	<i>G. tachinoides</i>
<b>Infected</b>	<b>50 (58.5%)</b>	<b>19 (32.1%)</b>
<b>T. congolense type</b>	<b>19 (17.5%)</b>	<b>2 (3.5%)</b>
<b>T. brucei type</b>	<b>17 (15.5%)</b>	<b>4 (7.0%)</b>
<b>T. simiae</b>	<b>17 (15.5%)</b>	<b>8 (14.0%)</b>
<b>T. vivax</b>	<b>12 (10.5%)</b>	<b>5 (8.5%)</b>
<b>T. brucei</b>	<b>4 (3.5%)</b>	<b>2 (3.5%)</b>

Table 5. Résultats PCR sur glossines infectées

Les infections par les trypanosomes du sous-genre *Nannomonas* ont représenté 80% des infections identifiées dans les deux espèces de glossines. Les infections identifiées comme matures par la PCR ont montré une répartition très différente, puisque *T. vivax* devenait le taxon majoritaire alors que les infections matures à *T. simiae* étaient presque inexistantes. La compétence vectorielle de *Gm. submorsitans* semble supérieure à celle de *G. tachinoides* ce qui confirme les données expérimentales (Harley et Wilson, 1968). Ces données permettent d'orienter la lutte antivectorielle.

Les taux d'identification des infections du proboscis seul étaient extrêmement faibles (39% chez *Gm. submorsitans* et 11% chez *G. tachinoides*) suggérant l'existence d'un variant génétique de *T. vivax* dans la zone, non identifié par les amorces utilisées (Masake *et al*, 1997).

Globalement ces résultats impliquent largement la faune sauvage du ranch comme réservoir non négligeable de trypanosomes pathogènes pour le bétail de la zone adjacente de Yalé.



### III. Thérapeutique expérimentale des glioblastomes

#### *Développement de la thématique*

Les modèles de glioblastomes, par injection intracérébrale à des rats ou des souris d'une lignée tumorale, ne reproduisent pas le caractère infiltrant et invasif des glioblastomes sauvages. Les traitements utilisés sur ces modèles se sont ainsi révélés inefficaces en thérapeutique du fait de la présence de cellules qui ont infiltré le tissu cérébral et migré à distance du foyer initial, et qui ne sont pas atteintes par la thérapeutique (Burger *et al*, 1989 ; Devaux *et al*, 1993). Notre objectif était d'établir, dans un modèle invasif de glioblastome, un système de distribution locale de l'agent thérapeutique à l'ensemble des cellules tumorales et en particulier aux cellules migratoires. Nous souhaitions réaliser une correction fonctionnelle chez le chien atteint de gliome spontané en utilisant les cellules tumorales elles mêmes, comme vecteur pour atteindre les cellules à distance du foyer tumoral. La vectorisation de cytokines nous permettrait d'induire une immunothérapie locale des glioblastomes.

Cette idée, fondée sur les données bibliographiques, nécessitait plusieurs étapes avant le protocole clinique. Nous avons d'abord développé des modèles *in vitro* et *in vivo* de glioblastomes invasifs. Dans ces modèles de tranches cérébrales ou de rats immunodéprimés greffés avec des cellules d'une lignée tumorale, nous avons caractérisé les voies de migration préférentielles. Nous avons pu montrer que ces voies de

migration étaient définies de façon stéréotypée et nous avons donc établi un protocole de double injection pour démontrer un éventuel suivi des mêmes voies de migration après injection des mêmes cellules tumorales irradiées dans la première tumeur déjà constituée. L'objectif de ces travaux étant d'utiliser des cellules autologues, nous avons développé la culture de glioblastome à partir de fragments biopsiques prélevés chez des patients ou chez des chiens. Parallèlement à ces travaux sur modèles expérimentaux nous avons développé à l'école vétérinaire les moyens pour réaliser un protocole clinique sur le Chien atteint de glioblastome spontané. Nous avons établi une collaboration avec le service de chirurgie et le centre de scanner afin de développer le recrutement de chiens atteints de tumeurs cérébrales. Les biopsies stéréotaxiques n'étant pas appliquées chez le Chien en raison notamment de la forte variation de format du crâne de l'animal, nous avons mis au point un cadre stéréotaxique adapté au chien et utilisable sous scanner, permettant de réaliser une biopsie avec une précision de 0,3mm.

Les travaux expérimentaux développés à partir de nos deux modèles de glioblastome invasif ont été à l'origine d'études plus larges sur ces glioblastomes en explorant notamment les interactions entre cellule tumorale et cellule hôte. Enfin ce modèle ouvre de nombreuses perspectives d'études thérapeutiques.

Les tumeurs gliales, gliomes au sens large, représentent 64 à 90% des tumeurs cérébrales primitives et sont responsables de 2,5% des décès imputables à un cancer (Black, 1991a). Les tumeurs gliales regroupent les astrocytomes, les oligodendrogliomes, les oligo-astrocytomes mixtes et les épendymomes. Les gliomes au sens stricte (tumeurs astrocytaires ou oligoastrocytaires) ont une incidence de 5 cas pour 100 000 personnes par an. Parmi les astrocytomes, les glioblastomes font partie des tumeurs primaires solides les plus agressives. Après diagnostic, la médiane de survie est de 6 à 12 mois (Black, 1991b). Le diagnostic histopathologique de glioblastome est fondé sur la présence de trois ou quatre des critères suivants : atypie nucléaire, mitose, prolifération endothéliale, nécrose. Ces données histologiques ont abouti plus généralement à des classifications par grade de malignité (classification de St Anne/Mayo, Daumas-Duport *et al*, 1988, et classification WHO, Kleihues *et al*, 1993). Bien que ces classifications restent le standard de la caractérisation des gliomes, elles apparaissent insuffisantes pour expliquer les variations dans chaque grade, pour poser un diagnostic et surtout un pronostic. Les altérations géniques pourraient dans l'avenir permettre une classification plus fonctionnelle.

Les altérations génétiques des gliomes (pour revue voir Bigner *et al*, 1998) incluent notamment des mutations du gène suppresseur de tumeur p53 (30% à 50% des cas) (Watanabe *et al*, 1997), une surexpression du PDGF (platelet-derived growth factor) et de son récepteur (Louis 1997), une altération de la voie du gène suppresseur de tumeur rétinoblastome (50% des astrocytomes anaplasiques) (Ueki *et al*, 1996). Des pertes d'hétérozygotie sur 19q (Smith *et al*, 1999), 11p et 10 (Weber *et al*, 1996) ont aussi été détectées. Les glioblastomes pourraient provenir d'une voie génétique différente (Kleihues et Oghaki 1999).

La plupart des glioblastomes (80%) apparaissent sans lésion préalable de plus bas grade et sont désignés comme glioblastomes primaires. Les autres glioblastomes se développent chez des patients plus jeunes en phase finale d'une évolution maligne d'un astrocytome, et sont dénommés glioblastomes secondaires. En comparaison aux glioblastomes primaires, ces glioblastomes secondaires sont caractérisés par une fréquence plus élevée des mutations sur p53 (Watanabe *et al*, 1997), une perte d'hétérozygotie sur 19q (Ohgaki *et al*, 2000), et une fréquence plus faible d'amplification d'EGFR (epidermal growth factor receptor) (Galanis *et al*, 1998), de mutation de PTEN (phosphatase and tensin homologue) (Tohma *et al*, 1998), de délétion sur CDKN2/p16 (Biernat *et al*, 1997), et de perte d'hétérozygotie sur le chromosome 10p (Fujisawa *et al*, 2000). Les pertes d'hétérozygotie sur le chromosome 19q (50-90% des cas), et/ou 1p (80% des cas)

sont les altérations les plus fréquentes observées dans les oligodendrogliomes (Bigner *et al*, 1999). Jusqu'à présent aucune corrélation clinique n'a pu être fermement établie avec une altération génétique unique, en revanche la perte du chromosome 19q et/ou du 1p dans les oligodendrogliomes a pu être démontrée comme un facteur prédictif d'une chimiosensibilité de ces tumeurs (Cairncross *et al*, 1998). Si une classification génétique des gliomes n'est pas prête de remplacer la classification histologique, les études génétiques permettraient de répondre à certains problèmes de diagnostic et de pronostic. La variabilité intratumorale pourrait aussi donner des indications sur le processus pathologique.

En dehors des épendymomes et de quelques astrocytomes, tous les autres gliomes envahissent de façon diffuse le parenchyme cérébral. Les gliomes, à l'inverse des cancers qui métastasent dans le cerveau, sont capables d'envahir le parenchyme cérébral sous forme de cellules individuelles ou par amas sans généralement le détruire (Bernstein 1996). En particulier, les glioblastomes peuvent infiltrer le parenchyme sans lésion visible à l'imagerie rendant impossible toute résection complète. Des cellules quittent le foyer tumoral, s'infiltrant et migrent dans le parenchyme cérébral sain alentour (Scherer, 1940, Bernard *et al*, 1987, Kleihues *et al*, 1995). L'infiltration est massive sur la totalité de la périphérie tumorale, les cellules restent en contact avec la masse tumorale par une extrémité. La migration est plus rare, les cellules se détachent de la tumeur et s'éloignent parfois de plusieurs centimètres. Elle s'effectue rapidement le long des faisceaux de fibres myélinisées, par exemple dans le corps calleux. Les gliomes n'envahissent que rarement le liquide céphalo-rachidien et ne provoquent qu'exceptionnellement des métastases. Les cellules infiltrées ou celles qui ont migré à distance de la tumeur sont responsables de la récurrence tumorale qui survient dans 100% des cas après retrait chirurgical de la tumeur primaire (Burger *et al*, 1989 ; Devaux *et al*, 1993). Il y a 60 ans, Scherer décrivait déjà, grâce à l'analyse *post mortem* de 120 glioblastomes non traités, des profils communs de migration des cellules tumorales. Les cellules de glioblastome migrent notamment le long des vaisseaux et des fibres myélinisées (Scherer, 1940 ; Burger *et al*, 1983). Une migration de cellules individuelles précède une invasion massive des tissus adjacents. Les cellules se détachent de la masse cancéreuse et adhèrent à différentes structures cellulaires ou à la matrice extracellulaire (MEC) via des molécules d'adhésion cellulaire, ce qui génère des mécanismes de motilité. Certains composants de la MEC comme la ténectine, la fibronectine et la laminine de la lame basale, jouent un rôle majeur dans la migration des cellules au cours du développement (Pedersen *et al*,

1993), ainsi que dans l'invasion tumorale en interagissant avec différentes intégrines surexprimées par les cellules de glioblastome (Paulus et Tonn, 1994 ; Tonn *et al*, 1998). Les cellules de glioblastome ont également la capacité de synthétiser des protéases ou des composants de la MEC qui entraînent un remodelage de la MEC alors plus permissive au déplacement des cellules tumorales (Apodaca *et al*, 1990 ; Knott *et al*, 1998).

Ce caractère invasif des glioblastomes compromet le traitement par chirurgie. De même, la radiothérapie et la chimiothérapie restent des mesures palliatives, et l'issue des glioblastomes reste uniformément fatale (Fine, 1994). Si la combinaison d'agents chimiothérapeutiques procarbazine-lomustine (CCNU) et vincristine (PVC) est efficace *in vitro*, l'existence de la barrière hémato-encéphalique et la synthèse de la glycoprotéine P (produit du gène MDR-1) qui expulse les agents chimiothérapeutiques confère une résistance aux cellules tumorales (Kornblith *et al*, 1988 ; Andrews *et al*, 1997). De plus la radiothérapie est toxique pour le système nerveux central, ce qui ne permet pas son utilisation optimale (Walker *et al*, 1978 ; Brüstle *et al*, 1992). La thérapie génique offre des perspectives encourageantes pour le traitement des glioblastomes. L'implantation chez l'animal de cellules productrices de vecteurs rétroviraux, ou directement de vecteurs rétro ou adénoviraux contenant le gène de la thymidine kinase (TK), permet le transfert de ce gène suicide aux cellules tumorales. Les cellules seront détruites après administration du ganciclovir, qui une fois phosphorylé par la TK empêche la synthèse de l'ADN et conduit à la mort cellulaire. Un effet de voisinage ("bystander") transmet le signal de mort cellulaire aux cellules alentour (Mesnil *et al*, 1996. Tamura *et al*, 1998). Il a également été démontré que l'immunostimulation déclenchée après injection de cellules modifiées pour synthétiser l'interleukine 2 ou l'interféron gamma augmente la survie d'animaux porteurs de glioblastome implantés (Lichter *et al*, 1995). Toutefois les cellules productrices sont en général des fibroblastes qui possèdent peu de capacité de migration. Même s'il y a bien destruction du foyer tumoral, les cellules tumorales infiltrées ne sont pas accessibles aux vecteurs viraux et provoquent la récurrence tumorale (Giese et Westphal, 1996).

#### *A. Greffe intracérébrale chez le rat immunodéprimé*

### **1- Introduction**

Les modèles *in vivo* qui utilisent des rongeurs greffés intracérébralement avec des cellules tumorales d'une lignée cellulaire chimiquement

induite, ne reproduisent que partiellement l'invasion du parenchyme cérébral et présentent généralement un haut pouvoir prolifératif qui induit la mort rapide de l'animal. Le système nerveux central offre des conditions privilégiées vis-à-vis des réactions immunitaires, qui rendent possible l'utilisation de xénogreffes de cellules issues de gliomes humains dans le cerveau de rongeurs immunodéprimés, et assurent ainsi des conditions proches de la situation clinique. Dans ces conditions expérimentales, les cellules de gliomes sont capables de survivre (Bernstein *et al*, 1989a). Nous avons utilisé des cellules de glioblastome d'origine clonale, les GL15. Nous avons tiré parti de l'expression spontanée par ces cellules des antigènes HLA ABC (antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité) pour identifier ces cellules *in vivo* et *in vitro*

### **2- Matériels et méthodes**

Les GL15 ont été maintenues en culture dans le milieu suivant : 50% MEM, 50% Dubelco Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), 10% SVF, 1mM pyruvate, 33mM glucose, 2mM glutamine, 100µg mL<sup>-1</sup> streptomycine, 100U mL<sup>-1</sup> pénicilline ; à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules à confluence ont été repiquées deux fois par semaine pour l'entretien des lignées. Après deux rinçages avec la solution saline de Hanks, les cellules ont été décollées par la trypsine EDTA 0,05% à 37°C pendant 2 mn, l'action de la trypsine a été stoppée par l'addition de milieu contenant du SVF, puis la solution a été centrifugées 10 mn à 300g. Le culot obtenu a été repris dans du milieu et remis en culture.

Pour la greffe, le culot a été repris dans 20 µL. Les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope. La concentration des GL15 a ensuite été ajustée à 10<sup>5</sup> cellules µL<sup>-1</sup>.

Des rats mâles Sprague Dawley (Janvier), pesant 280 to 300g ont été utilisés pour les greffes. Les rats ont été anesthésiés, placés dans un cadre stéréotaxique. Après incision de la peau, un trou de 1 mm de diamètre a été réalisé aux coordonnées stéréotaxiques déterminées par l'expérience (injection dans le cortex ou dans le striatum). Les cellules ont été injectées lentement (10 minutes y compris la remontée) à l'aide d'une aiguille Hamilton, à raison de 10<sup>5</sup> cellules par µl (1 à 3 µl par injection).

Dans les expériences de double injection, la seconde a été réalisée aux mêmes coordonnées stéréotaxiques à l'exception d'un décalage latéral de 300µM, et en profondeur de 2 mm, 3 semaines après la première, en ayant repéré le site d'injection par un micropoint chirurgical.

La Cyclosporine A (Sandoz, IP, 15 mg/kg/j) a été utilisée pour limiter un rejet de la xénogreffe. Autour de la seconde injection (2 jours avant à 3



jours après), nous avons complété l'immunosuppression et limité la réaction inflammatoire par l'utilisation de dexaméthasone.

Les rats profondément anesthésiés au pentobarbital sodique ont été perfusés avec du PBS puis du paraformaldéhyde 4%. Le cerveau a été enlevé, post fixé 12h, cryoprotégé par immersion dans du sucre 30%, puis congelé. Des sections coronales de 36 microns d'épaisseur ont été réalisées au cryostat. Des coupes ont été colorées au cresyl violet ou utilisées pour l'immunohistochimie. Les anticorps dirigés contre les protéines suivantes ont été utilisés : GFAP (1:400, Sigma) pour les astrocytes, OX42 (1:1000, Serotec) pour la microglie, OX19 (1:1000, Serotec) pour les lymphocytes, HLA ABC (1:200, Dako) pour les GL15 et 8 MG-BA, et Laminine (1:500, Dako) pour les vaisseaux. La détection immunohistochimique a été complétée par un anticorps secondaire biotinylé et le complexe peroxydase avidine-biotine ou par un anticorps secondaire fluorescent

### 3- Résultats

Les GL15 greffées ont survécu et se sont développées dans le cerveau de rat immunodéprimé dans plus de 90% des cas sans réponse immunitaire apparente ni toxicité de l'immunosuppression.

Dix jours après la greffe, la masse tumorale présentait une forme allongée dorso-ventralement selon le trajet de l'aiguille. Quelques cellules se sont détachées de la masse tumorale, et ont pénétré dans le striatum. A 15 jours, la masse tumorale était plus sphérique, le centre correspondant à la trace de l'aiguille, était composé exclusivement de cellules tumorales, tandis que la périphérie correspondait à un mélange de GL15, d'astrocytes et de microglie de l'hôte (Figure 1). La tumeur et sa marge étaient fortement néovascularisées (Figure 2). Avec le temps, la tumeur s'est développée et a infiltré le tissu hôte avec un patron différent selon la structure concernée (Figure 3). Vingt-deux jours après la greffe, des colonnes de cellules tumorales étaient observées radialement à la tumeur. Ces cellules étaient alignées le long des vaisseaux sanguins et progressaient plus loin que les cellules en infiltration péritumorale (Table 6).

Dans la substance blanche et plus particulièrement dans le corps calleux, les cellules tumorales étaient toutes orientées parallèlement aux fibres axonales.

Un et deux mois après la greffe, la tumeur était largement développée et présentait 3 différents types d'invasion intraparenchymateuse (Figure 4). Premièrement, la zone d'infiltration dense était agrandie, et présentait un gradient de densité des cellules tumorales de l'intérieure vers l'extérieure de la masse. Cette infiltration locale regroupait la grande majorité des cellules tumorales en infiltration. Deuxièmement, les cel-

lules tumorales pénétraient dans la substance grise, le long des capillaires. Quelques cellules avaient atteint le ventricule latéral et entraient dans la paroi épendymaire. La distance maximale de migration atteignait 700 microns à deux mois. Troisièmement, les cellules s'étaient dispersées dans les fibres de la substance blanche, plus précisément dans le corps calleux et la capsule interne. Dans le premier, des cellules avaient migré à plus de 5 millimètres à deux mois dans l'hémisphère contra-latéral.

Les GL15 implantées présentaient des morphologies variées dépendantes de l'environnement dans lequel elles migraient (Figure 5). Dans la masse tumorale, la densité a empêché une analyse de la taille et de la forme cellulaire, mais les cellules apparaissaient arrondies avec peu de prolongements. Dans la zone d'infiltration de la substance grise, la plupart des cellules présentaient une morphologie similaire, mais certaines avaient un corps cellulaire oblonge, une forme bipolaire avec deux longs prolongements. Dans le corps calleux, les cellules orientées le long des fibres présentaient une morphologie bipolaire avec de longs prolongements et un petit corps cellulaire, mais certaines cellules à 1 et 2 mois étaient étoilées avec des prolongements ramifiés. Les cellules tumorales observées le long des capillaires montraient de longs corps cellulaires allongés avec des prolongements fins en contact les uns avec les autres ou avec la paroi capillaire. Certains prolongements entouraient les capillaires.

La technique de réinjection de GL15 dans le site de la première tumeur a été possible en réalisant les injections aux mêmes coordonnées stéréotaxiques que pour les simples injections. Nous avons simplement modifié la profondeur afin d'implanter les cellules dans le cortex à la limite du corps calleux. Le décalage latéral de la seconde injection de 300µM a été réalisé afin d'éviter d'injecter dans la masse tumorale qui, à 3 semaines, était fortement vascularisée. Trois jours après la seconde injection, nous avons pu obtenir la formation de tumeurs adjacentes dont les cellules en invasion étaient mélangées (Figure 6). Quinze jours après la seconde injection, on observait une disparition des cellules tumorales provenant des deux injections. Les marquages OX42 et OX19 ont mis en évidence une forte infiltration microgliale et lymphocytaire dès 3 jours après la seconde injection dans la périphérie de la seconde tumeur (Figure 7).

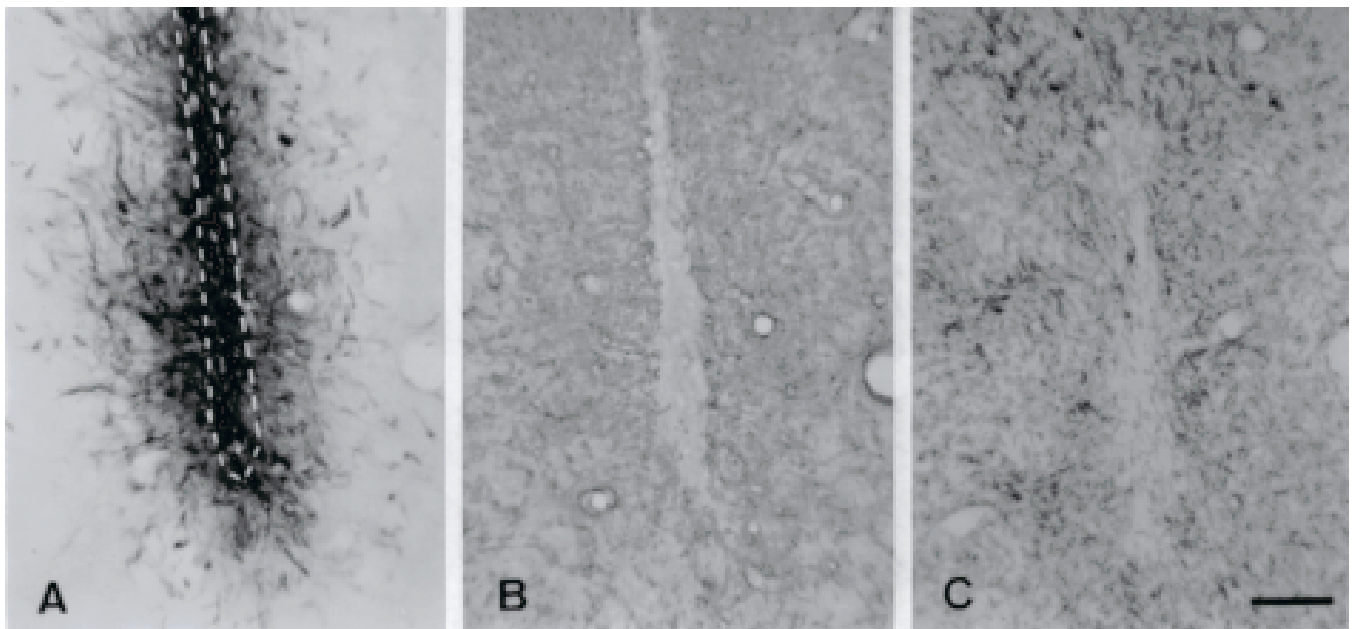


Figure 1. Infiltration péritumorale à 15 jours post-implantation.

Trois sections adjacentes de la même zone tumorale. A: Immunomarquage HLA ABC (GL15). B: Immunomarquage GFAP (astrocytes). C: Immunomarquage OX42 (microglie). Les GL15 ne sont pas marquées par l'anticorps anti-GFAP. Le site d'injection ne comporte pas de cellules non tumorales. Autour de ce site (trait discontinu), les cellules tumorales se sont dispersées et ont formé une zone dense d'infiltration. La comparaison des trois figures montre que les cellules en infiltration se sont étroitement mélangées avec la glie hôte. Barre = 150  $\mu$ m.

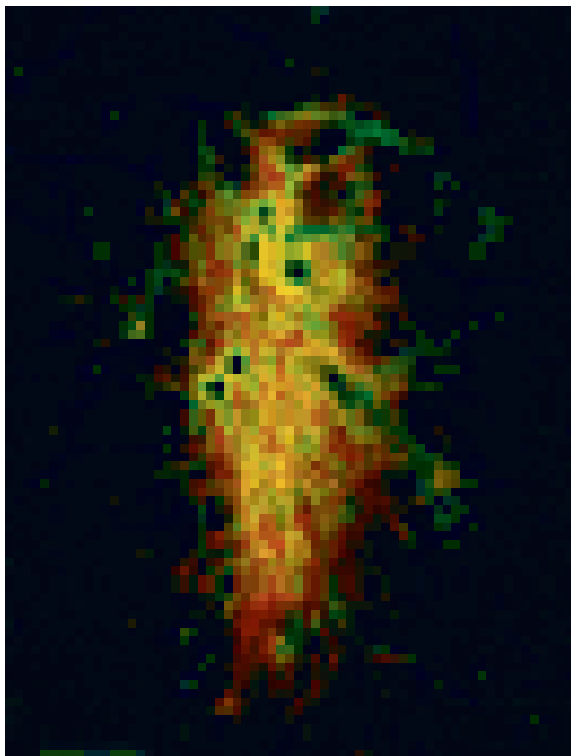


Figure 2. Angiogenèse tumorale à 15 jours post-implantation.

Immunomarquage laminine (FITC, vert) et HLA-ABC (Cy3, rouge). Des vaisseaux sont visibles en coupe au sein de la tumeur et dans la marge tumorale. Barre = 300  $\mu$ m.

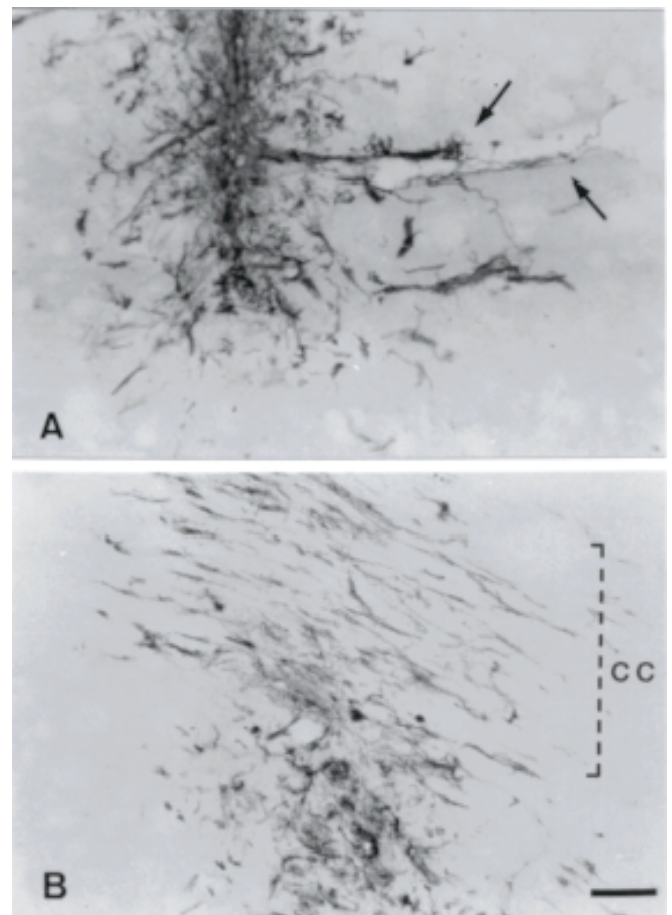


Figure 3. Voies de migration des cellules tumorales

Immunomarquage HLA-ABC 20 jours après implantation. A: dans la substance grise striatale, des cellules alignées pénètrent le parenchyme le long des vaisseaux (flèches). B: dans la substance blanche (corp calleux-cc), les cellules tumorales migrent le long des fibres. Barre = 100  $\mu$ m.

	J 10 n=4	J 15 n=4	J 20 n=4	J 30 n=2	J 60 n=2
<b>Infiltration pŽritumorale</b>	<b>0.149</b> ± 0.047	<b>0.161</b> ± 0.013	<b>0.181</b> ± 0.024	<b>0.350</b> (0.3,0.4)	<b>0.550</b> (0.5,0.6)
<b>Migration pŽrivasculaire</b>	<b>0.337</b> ± 0.063	<b>0.325</b> ± 0.065	<b>0.425</b> ± 0.119	<b>0.725</b> (0.7,0.75)	<b>0.775</b> (0.8,0.75)
<b>Migration dans la substance blanche</b>	<b>0.512</b> ± 0.206	<b>0.687</b> ± 0.131	<b>0.917 *</b> ± 0.520	<b>3.250</b> (3.5,3)	<b>4.750</b> (4.5,5)

Table 6. Distance moyenne de migration des cellules tumorales.

La distance (en millimètres ± déviation standart quand n=4) est mesurée du centre de la zone d'inoculation aux cellules qui ont migré dans le striatum pour l'invasion pėritumorale (cellules en contact avec la masse tumorale), le long des vaisseaux sanguins pour la migration pėrivasculaire, et dans le corps calleux pour la migration dans la substance blanche.

Sur un animal à J20 (\*) la tumeur s'est développée en profondeur dans le striatum et aucune cellule n'a été observée dans le corps calleux. Ce cas a été exclu des calculs de moyenne. J = jour du sacrifice

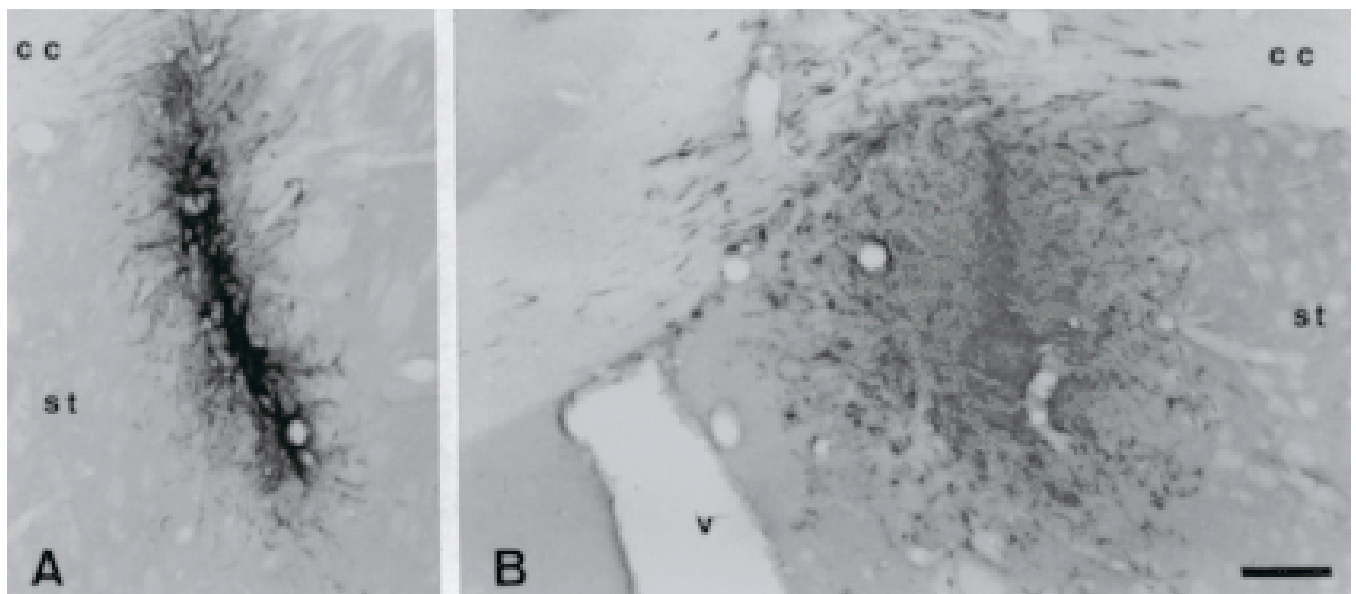


Figure 4. Progression de la zone tumorale.

Immunomarquage HLA-ABC. A: 20 jours après implantation. B: 60 après implantation. st: striatum; cc: corps calleux; v: ventricules. Barre = 250 μm.



Figure 5. Morphologie des cellules tumorales en infiltration.  
Immunomarquage HLA-ABC. A: cellules tumorales bipolaires allongées le long d'une paroi capillaire 20 jours après implantation. B: cellule tumorale (tête de flèche) avec un grand corps cellulaire et un prolongement court dans la paroi épendymaire, 30 jours après implantation. C: cellule tumorale avec un grand corps cellulaire et un prolongement court et épais dans la zone d'infiltration. D: Cellules tumorales avec des petits corps cellulaires et de longs prolongements fins alignées le long des fibres axonales du corps calleux, et E: dans la capsule interne. F: cellules tumorales étoilées multipolaires à la limite de la zone d'infiltration, 60 jours après implantation. v: ventricule; st: striatum; cc: corp calleux; ic: capsule interne. Barre = 100  $\mu$ m pour E, 50  $\mu$ m pour les autres figures.

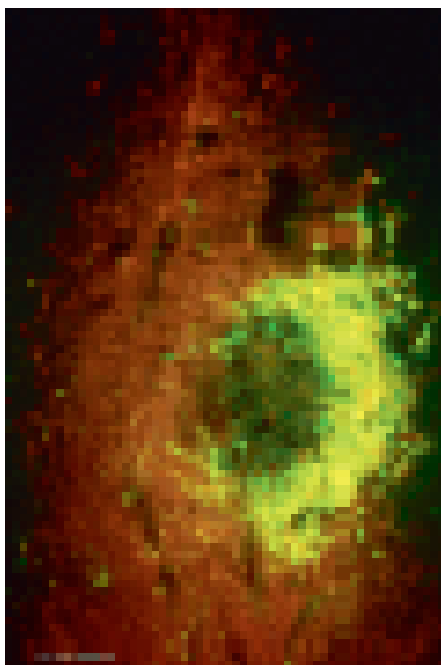
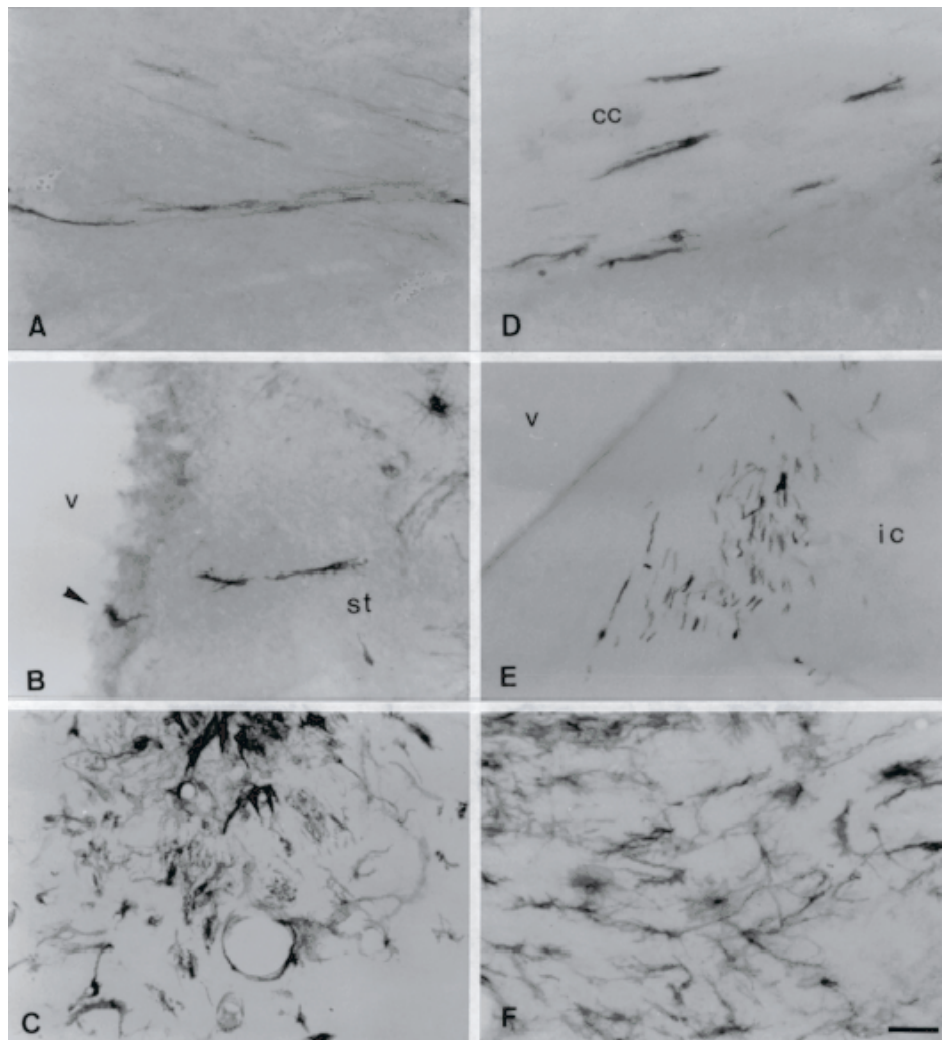


Figure 6. Double injection de cellules tumorales.  
Immunomarquage HLA-ABC et GL15-GFP à 3 jours après la seconde injection. On visualise deux masses tumorales ainsi que des cellules en infiltration mélangées. Des cellules tumorales au centre de la seconde tumeur (GL15-GFP, vert) présentent un aspect nécrotique. Barre = 150  $\mu$ m.

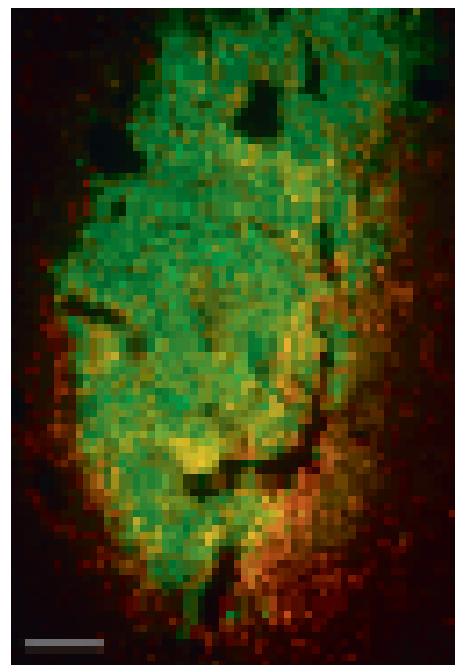


Figure 7. Réaction lymphocytaire dans la double injection.  
Immunomarquage OX19 et GL15-GFP à 3 jours après la seconde injection. Barre = 150  $\mu$ m.

#### 4- Discussion

En utilisant une xénogreffe de cellules issues d'une lignée de glioblastome humain implantées dans le cerveau de rat immunodéprimé, nous avons caractérisé le patron d'invasion des cellules tumorales en relation avec les structures parenchymateuses de l'hôte. Deux conclusions majeures peuvent être données : 1- Le patron d'invasion des cellules tumorales est relativement stéréotypé, avec une grande majorité de cellules infiltrant lentement le parenchyme autour du site d'injection, et un petit nombre de cellules migrant à distance le long des vaisseaux sanguins ou dans les trajets de substance blanche. 2- Dans ces trois voies majeures, la topographie des cellules, la vitesse de déplacement, et la morphologie cellulaire apparaissent sensiblement différentes. Ceci suggère des mécanismes différents fondés sur des interactions spécifiques cellules tumorales-parenchyme.

##### **Invasion stéréotypée des cellules tumorales**

Trois voies majeures de déplacement des cellules tumorales ont été observées, une infiltration locale dans le parenchyme, un déplacement périvasculaire de cellules alignées, et un déplacement dispersé dans les fibres de la substance blanche. Ces voies préférentielles sont similaires à celles décrites pour les cellules de glioblastome dans des séries nécropsiques de patients (Scherer *et al*, 1940) ou dans des biopsies (Daumas-Duport *et al*, 1987). En particulier, la migration le long des fibres myélinisées est responsable d'extensions contralatérales des tumeurs à travers le corps calleux. Nos résultats confirment et renforcent ceux déjà obtenus avec la technique de xénogreffe utilisant des cellules issues d'échantillons chirurgicaux (Bernstein *et al*, 1989a; Bernstein *et al*, 1989b; Pedersen *et al*, 1993; et Finkelstein *et al*, 1994). Le corps calleux et l'espace périvasculaire sont confirmés comme des voies majeures de migration. Une distribution similaire de la migration a été observée lors de greffe intracérébrale d'astrocytes fœtaux (Emmet *et al*, 1991 ; Jacque *et al*, 1992 ; Pedersen *et al*, 1993 ; Quinonero *et al*, 1993) et de cellules astrocytaires immortalisées (Okoye *et al*, 1995), suggérant des mécanismes communs de migration développementale et néoplasique.

Dans les études précédentes de xénogreffes de cellules tumorales humaines, les cellules étaient retrouvées à la surface du cerveau et dans les espaces de Virchow-Robin. Cette dispersion était interprétée comme une conséquence d'une migration active des cellules ou d'un déplacement dans le liquide céphalorachidien (Bernstein *et al*, 1989b; Pedersen *et al*, 1995). Nous n'avons pas observé ce cas de figure dans notre étude. Cette différence peut être imputée à des capacités variables des différents types cellulaires ou à la procédure d'implantation des cellules conduisant à la dispersion de cellules dans le liquide céphalorachidien. Une vitesse élevée d'injection

ou un grand volume peuvent induire un passage des cellules implantées dans les espaces de moindre résistance, ou un reflux le long de l'aiguille jusqu'à la surface cérébrale (Ram *et al*, 1997).

En dehors de ces deux voies préférentielles déjà décrites, nous avons observé que les cellules tumorales envahissaient massivement le parenchyme cérébral dans la périphérie de la masse tumorale en se mélangeant étroitement avec les cellules normales. Cette invasion était caractérisée par une faible distance de migration. La progression dans l'espace de la tumeur ne semblait pas guidée par les structures anatomiques. Cette infiltration massive de cellules peut avoir une signification clinique de première importance. Il est en effet connu que la récurrence des glioblastomes après résection de la masse tumorale survient le plus souvent à proximité immédiate (Albert *et al*, 1994). Cette caractéristique a conduit au développement de thérapies expérimentales utilisant des vecteurs viraux portant un gène suicide injecté dans le pourtour de la masse tumorale résectée (Ram *et al*, 1997; Klatzmann *et al*, 1998).

La plupart des modèles de glioblastomes fondés sur l'implantation de cellules issues des lignées C6 et 9L ne montre pas une telle invasion de proximité. Ces gliomes apparaissent plutôt comme une masse tumorale compacte avec un fort taux de prolifération et sans migration cellulaire (San-Galli *et al*, 1989 ; Peterson *et al*, 1994). Il est intéressant de noter, comme une possible explication de ces différences, que les lignées de gliome de rat ont été obtenues à partir de tumeurs induites chimiquement et non de glioblastome spontané. Quelle que soit l'origine des différences de migration, on peut considérer qu'il y a peu à attendre de ces modèles quant à l'étude de la migration cellulaire. De même, la récurrence des glioblastomes étant associée à la prolifération de cellules ayant migré, l'étude de molécules thérapeutiques devra utiliser des modèles reproduisant cette migration.

##### **Mécanismes potentiels de l'invasion intraparenchymateuse des GL15**

Le support biologique de l'invasion des cellules de gliome n'est pas parfaitement connu. L'analyse de la migration des GL15 met en évidence trois types de comportement cellulaire et il est tentant, bien que spéculatif, de les relier à des interactions avec des environnements différents. Le parenchyme entourant le site d'injection semble permissif et peu spécifique puisqu'une grande quantité de cellules se mélange aux cellules hôtes dans cette zone. La morphologie cellulaire peu différente de celle observée dans la masse tumorale suggère aussi le peu d'effet des mécanismes d'interaction sur la physiologie cellulaire. A l'opposé, peu de cellules ont été observées en migration le long des vaisseaux, mais elles semblent trouver un substrat spécifique auquel elles sont attachées le long des parois vasculaires, par des prolongements particuliers. Dans le corps

calleux, l'absence de masse tumorale, s'il peut éventuellement être relié au protocole d'injection, peut aussi être imputé à une sortie rapide du site d'injection quand les cellules sont placées dans un faisceau de substance blanche. La position des cellules en particulier à des temps élevés, démontre l'existence d'un déplacement le long de ces fibres parmi les axones, et la grande vitesse de déplacement indique la présence d'un substrat moins adhésif que le long des vaisseaux sanguins. La morphologie des cellules qui sont principalement bipolaires sans prolongement digités, suggère des mécanismes différents de déplacement de ceux impliqués dans la migration périvasculaire.

Parmi les facteurs microenvironnementaux qui peuvent influencer la mobilité cellulaire, les composants de la matrice extracellulaire ont été largement étudiés (Pedersen *et al*, 1993; Giese et Westphal, 1996; Friedlander *et al*, 1996; Gladson, 1999). Les trois voies de déplacement identifiées correspondent à des compositions profondément différentes de matrice extracellulaire. La substance grise contient de l'acide hyaluronique, des protéoglycanes à chondroïtine sulfate, du brevican, de la tenascine... (Rutka *et al*, 1988; Bignami *et al*, 1993; Asperg *et al*, 1997). La lame basale des vaisseaux contient de la laminine, fibronectine, du collagène (types IV et V), de la vitronectine et de l'héparan sulfate (Giese *et al*, 1995; Gladson, 1999). La substance blanche semble contenir des molécules similaires à celles de la substance grise, mais les protéines associées à la myéline pourraient en plus intervenir dans des interactions spécifiques (Giese *et al*, 1996a). Alternativement, un simple déplacement dans les plans de moindre résistance peut être envisagé pour expliquer la migration dans les faisceaux de substance blanche (Bjekvig *et al*, 1997). Cette explication ne peut clairement pas s'appliquer à la migration le long des vaisseaux du fait des parois vasculaires formées de prolongements cellulaires fortement attachés à la lame basale (Wolburg et Risau, 1995). Ces multiples mécanismes de migrations limitent l'utilisation d'une thérapeutique anti-invasion dirigée contre un système unique de migration.

La technique de réinjection des cellules tumorales n'a pas pu démontrer de suivi des voies de migration en raison d'une réaction inflammatoire et immunitaire massive conduisant à la mort des cellules tumorales malgré l'immunosuppression, l'utilisation de corticoïdes et le décalage de la seconde injection pour éviter les vaisseaux néoformés. Un modèle de glioblastome invasif sans possibilité de réaction inflammatoire et immunitaire devra être utilisé pour étudier le suivi des voies de migration dans les doubles injections.

## 1- Introduction

L'analyse anatomopathologique des biopsies donne des informations importantes sur la prolifération mais ne permet pas d'évaluer le caractère invasif. Une évaluation précoce de ce caractère majeur des gliomes pourrait aider au choix thérapeutique. Les expériences *in vitro* utilisant des protéines de la matrice extracellulaire (Giese *et al*, 1994; Friedlander *et al*, 1996; Tamaki *et al*, 1997), de la myéline (Giese *et al*, 1996a; Amberger *et al*, 1998), des membranes basales reconstituées artificiellement (De Hauwer *et al*, 1997) ou des agrégats fœtaux (Knott *et al*, 1998), ont suggéré que certains substrats de la matrice extracellulaire, les intégrines et les systèmes protéolytiques pourraient être préférentiellement impliqués dans l'adhésion cellulaire, l'invasion et la migration des glioblastomes. En revanche, ces modèles expérimentaux ne peuvent refléter la complexité de l'architecture cérébrale et des interactions des cellules hôtes avec les cellules tumorales. Les modèles *in vivo* apportent des informations complémentaires sur les voies d'infiltration et mettent en avant des interactions potentielles avec le tissu hôte (Pedersen *et al*, 1993; Bernstein et Woodard, 1995; Pedersen *et al*, 1995; Paulus *et al*, 1996; Owens *et al*, 1998), mais sont difficiles et coûteux à mettre en œuvre. Les cultures organotypiques de cerveau sont connues pour survivre plusieurs semaines en culture en conservant l'architecture et les composants de la matrice extracellulaire, les rendant utiles pour les études morphologiques, électrophysiologiques et pharmacologiques (Gähwiler *et al*, 1997). Dans cette étude, nous avons mis au point un système *in vitro* nous permettant d'analyser le comportement des cellules de gliome en utilisant des cultures organotypiques de tranches cérébrales de souris nouveau nées dans lesquelles des cellules tumorales humaines ont été implantées et se sont développées jusqu'à 4 semaines. Les comportements invasifs de deux lignées de glioblastome humain (GL15 et 8MG-BA) et une lignée de rongeur (C6), ont été comparés en raison de capacités invasives différentes observées dans l'expérience de xénogreffe intracérébrale chez le rat (seules les GL15 se sont infiltrées dans le parenchyme hôte). Le suivi de voies de migration déterminées a été démontré dans ce modèle grâce à une seconde injection de cellules tumorales modifiées pour exprimer la protéine fluorescente verte (GFP).



## 2- Matériel et méthodes

### Culture de tranche de cerveau

Les tranches ont été préparées à partir de cerveaux de souris selon une version modifiée de la méthode décrite par Stoppini *et al* (1991). Des souris mâles C57/bl6 (Janvier) âgées de 7 jours ont été décapitées. Après ouverture de la boîte crânienne, le cerveau a été prélevé rapidement en conditions stériles. Les manipulations suivantes ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire horizontal. Le cerveau a été déposé dans du PBS (tampon phosphate saline), avec 0,5% D-glucose. Les bulbes olfactifs et le cervelet ont été retirés. Après section inter-hémisphérique, nous avons obtenu des tranches coronales de chaque hémisphère de 400  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide d'un tissu chopper McIlwain (Laboratoire Mickel). Les tranches ont été transférées dans du milieu de culture tranche : Minimal Essential Medium (MEM, Gibco), additionné de 10% sérum de veau fœtal (SVF, Gibco) décomplémenté, 1mg  $\text{mL}^{-1}$  D-glucose, 2mM glutamine, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$  sérum albumine bovine, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$  transferrine, 16ng  $\text{mL}^{-1}$  putrescine, 40ng  $\text{mL}^{-1}$  N-sélénium, 30ng  $\text{mL}^{-1}$  tri-iodothyronine, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$  insuline et 60ng  $\text{mL}^{-1}$  progestérone (Sigma). Après séparation sous loupe binoculaire, les tranches contenant une portion d'hippocampe ont été mises en culture sur des membranes Millicell-CM (Millipore, France) et déposées dans des boîtes à six puits contenant 1 ml de milieu chacun. Les tranches ont été maintenues en culture à 36°C dans une atmosphère humide contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Le milieu a été changé trois fois par semaine.

### Lignées de glioblastomes

Deux lignées de glioblastomes humains ont été utilisées, la lignée GL15 (Bocchini *et al*, 1991) et la lignée 8-MG-BA (Perzelova *et al*, 1998). La lignée C6 chimiquement induite chez le rat a aussi été utilisée comme témoin de cellules non infiltrantes. Les cellules ont été maintenues en culture dans le milieu suivant : 50% MEM, 50% Dubelco Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), 10% SVF, 1mM pyruvate, 33mM glucose, 2mM glutamine, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycine, 100U  $\text{mL}^{-1}$  pénicilline ; à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de  $\text{CO}_2$ . Les cellules à confluence ont été repiquées deux fois par semaine pour l'entretien des lignées. Après deux rinçages avec la solution saline de Hanks, les cellules ont été décollées par la trypsine EDTA 0,05% à 37°C pendant 2 mn, l'action de la trypsine a été stoppée par l'addition de milieu contenant du SVF, puis la solution a été centrifugée 10 mn à 300g. Le culot obtenu a été repris dans du milieu et remis en culture. Pour la greffe, le culot a été repris dans 20 à 50  $\mu\text{L}$  de milieu tranche. Les cellules ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope. La concentration des GL15 a ensuite été ajustée à  $5.10^4$  cellules  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### Production des GL15-GFP.

Des clones producteurs pseudotypes GALV ont été obtenus avec la construction FOCHA-EGFP1 (Cohen-Haguenauer *et al*, 1998) après transfection dans la lignée packaging TE-FLYA puis infection des TE-FLY-GA (lignées fournies par Cosset *et al*, 1995). Un plasmide codant pour le gène de résistance à la néomycine, pEWLNeo (Stratagene), a été co-transfecté avec FOCHA-GFP. Un premier cycle de sélection a été réalisé par le G418. Les clones producteurs candidats ont été sélectionnés selon l'intensité de fluorescence chez les producteurs et chez une lignée test transduite (NIH3T3). Les clones avec le titre le plus haut (106 cfu/ml) ont été sous-clonés, permettant d'obtenir une fluorescence d'intensité homogène. Parmi eux un producteur stable a été sélectionné avec un titre de 108 cfu/ml pendant plusieurs mois et utilisé pour transduire les cellules packaging TE-FLY-GA afin d'isoler un clone producteur GALV. Les cellules transduites ont été cultivées en dilution limite. Le clone 4B3 a été sélectionné pour le plus haut titre mesuré après infection de cellules test humaines (TE-671 et 293-T, 107 cfu/ml).

Les GL15 ( $2 \times 10^5$ ) ont été cultivées dans leur milieu précédemment décrit. Un essai de mobilisation a permis de démontrer que le supernageant viral ne présentait pas de rétrovirus compétant en répllication (RCR). Les GL15 ont été exposées à un seul cycle d'infection en utilisant 5 ml de supernageant rétroviral avec 8  $\mu\text{g/ml}$  de polytrene pendant 24 heures. Du milieu frais a été ajouté 24 heures après. A 72 heures, presque toutes les cellules se sont révélées EGFP-1 positives en observation au microscope à fluorescence. Les GFP-GL15 ont été recultivées dans le même milieu afin de créer une banque et de les tester pour les RCR qui n'ont pas été détectés.

### Injection des cellules tumorales

Les injections ont été réalisées le lendemain de la mise en culture des tranches (J1). Cinq  $10^3$  cellules tumorales dans 0,1  $\mu\text{L}$  de milieu tranche ont été injectées, en 2 minutes, à l'interface cortex/corps calleux, le plus dorsalement possible à l'aide d'une seringue Hamilton biseautée (0,5  $\mu\text{L}$ , Roucaire, France) (Figure 8). Le lieu et la profondeur de l'injection ont été contrôlés par un micromanipulateur. Pour les doubles injections, la seconde injection de  $2,5.10^3$  GL15 GFP dans 0,025  $\mu\text{L}$  de milieu a été réalisée à J15 au niveau du site primaire d'injection.

### Irradiation des cellules tumorales

Les cellules ont été irradiées dans les bouteilles de culture avec une source au Cobalt la veille de l'injection dans les tranches cérébrales. Elle ont reçu une dose unique de 25 Gy. Le nombre de cellules marquées par un anticorps MIB1 a été obtenu par comptage manuel, et a servi pour l'évaluation de la prolifération cellulaire (Figure 9).

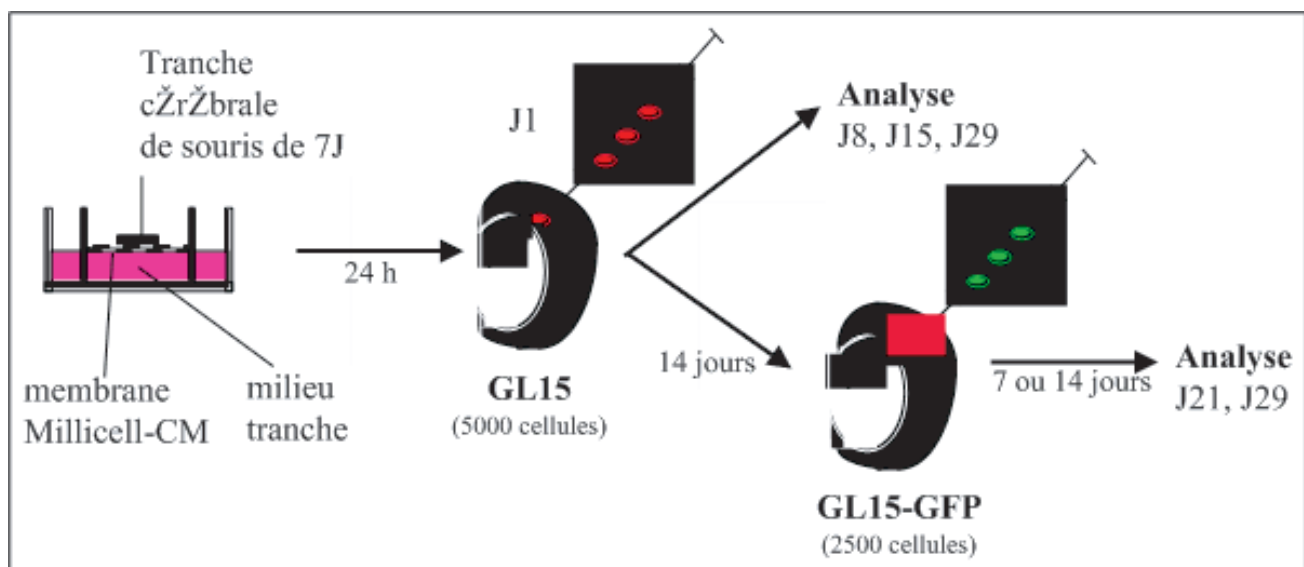


Figure 8. Représentation schématique du protocole d'injection unique ou double des cellules tumorales dans la tranche cérébrale de souris.

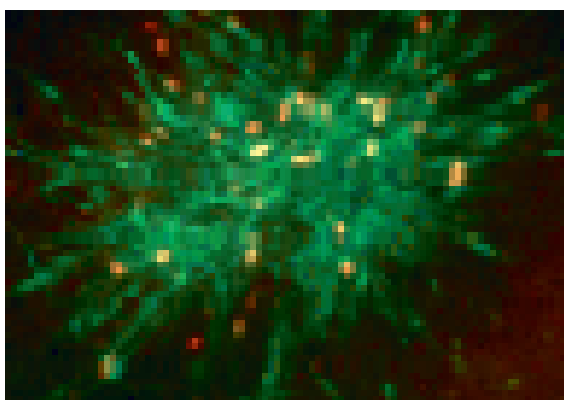


Figure 9. Immunomarquage MIB1 et GL15-GFP à J15.

### Immunocytochimie

Les tranches ont été fixées à J8, J15 ou J29 par du paraformaldéhyde 4% dans du tampon phosphate pendant 4 heures à 4°C. Les tranches ont été décollées des filtres puis transférées dans du PBS.

Les tranches ont été rincées trois fois 10 mn dans du PBS, puis incubées 1 heure dans une solution de perméabilisation et de neutralisation : PBS, 0,6% Triton X-100, 10% sérum normal de cheval (NHS). Les tranches ont été incubées une nuit à 4°C dans le PBS, 0,6% Triton X-100 avec les anticorps monoclonaux anti HLA ABC (1/200, Dako), protéine basique de la myéline (MBP, 1/200, Serotec), MIB-1 (1/200, Immunotech), vimentine (1/100, Dako), neurofilaments 200 (NF200) (1/100, Boehringer), MAP2 (1/100, Boehringer), et polyclonaux laminine (1/200, Sigma), protéine acide des gliofilaments (GFAP, 1/400, Dako), facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, 1/100, Tebu). Après trois rinçages de 10 mn au PBS, l'anticorps secondaire, dilué dans PBS, 0,3% Triton X-100 a été ajouté pendant 3 heures : Cy3 anti-IgG de lapin, Cy3 anti-IgG de souris (1/1000 Jackson Immuno Research), FITC anti-IgG de lapin, FITC anti-IgG de souris (1/200 Vector). Les

tranches ont été à nouveau rincées trois fois 10 mn puis montées sur des lames gélatinées dans 50% de vectashield et 50% PBS pour l'observation au microscope à fluorescence et au microscope confocal.

### Quantification

#### *Infiltration et migration*

La quantification de l'infiltration et de la migration a été réalisée sur huit tumeurs provenant de 3 expériences à J8, 10 de 4 expériences à J15, et 9 de 2 expériences à J29 (Figure 10). Après superposition de dix coupes réalisées dans l'épaisseur de la tumeur à l'aide d'un microscope confocal, les mesures de la surface totale tumorale, du diamètre de la masse tumorale, et du diamètre de la zone d'infiltration ont été réalisées par un système d'analyse d'image (analyse con-

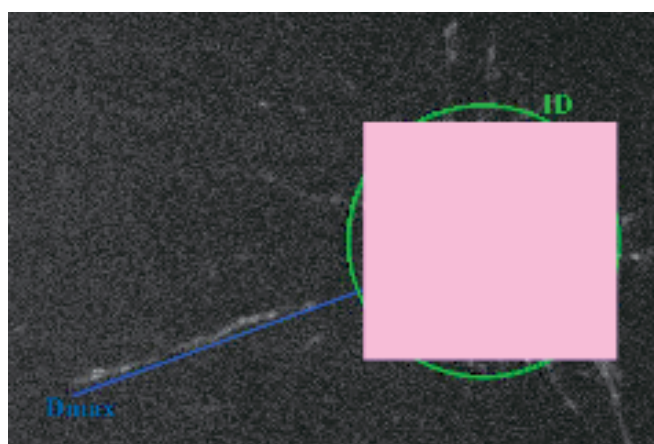


Figure 10. Quantification de l'infiltration et de la migration des cellules tumorales.

TMD (cercle rouge) : diamètre de la masse tumorale. ID (cercle vert) : diamètre d'infiltration qui concerne les cellules encore en contact avec la masse tumorale. IS (zone rose) : surface d'infiltration. Dmax (droite bleue) : distance maximale de migration.

focale et “blob analysis”, logiciel inspector).

La surface occupée par les cellules dans la zone d’infiltration a été calculée : surface totale - surface du foyer tumoral. Le nombre de cellules à plus de 500µm de la tumeur et la distance maximale de migration ont été mesurés manuellement sous microscope à l’aide d’une grille de dimension connue. La reproductibilité des mesures a été évaluée en comparant, à l’aide d’un test ANOVA ou d’un test de Student sur valeurs non appariées, les moyennes de 2 à 4 expériences à chaque temps. L’analyse comparative statistique a été réalisée par un test de Student sur séries non appariées.

#### *Morphologie cellulaire*

La quantification de la morphologie cellulaire a été réalisée sur 37 à 68 cellules tumorales sur 6 tranches différentes à chaque temps. Les longueurs des cellules invasives le long des vaisseaux, dans les fibres de substance blanche et dans la zone d’infiltration ont été mesurées à l’aide d’un système d’analyse d’image. La morphologie cellulaire a été appréciée par le rapport du diamètre nucléaire maximum sur le diamètre minimum. Des sections de 10 µm ont été réalisées dans la masse tumorale pour visualiser cette morphologie cellulaire. L’analyse comparative statistique a été réalisée par un test de Student sur séries non appariées.

#### *Angiogenèse*

La quantification de l’angiogenèse a été réalisée en comparant la densité des vaisseaux et leur orientation par rapport à la masse tumorale dans 5 à 12 tranches injectées avec les deux lignées cellulaires à chaque temps.

L’analyse a porté sur des images de 0.27 mm<sup>2</sup> acquises en continuité de la masse tumorale dans la périphérie obtenues après marquage laminine pour visualiser les vaisseaux. La densité des vaisseaux est exprimée en pourcentage de surface occupée par les vaisseaux. L’orientation des vaisseaux a été quantifiée en mesurant l’angle entre l’axe longitudinal des vaisseaux visibles et la tangente correspondante à la tumeur. Plus l’angle (réel ou d’intersection potentielle) est proche de 90° plus les vaisseaux ont de chances de pénétrer dans la tumeur. Les angles ont été transformés en leur valeur correspondant en sinus. Cent trente cinq  $\pm 118$  angles ont été évalués par cas. La médiane des angles et la valeur correspondant aux 25 percentiles ont été utilisées pour les comparaisons statistiques à l’aide d’un test non paramétrique de Mann et Whitney.

### **3- Résultats**

Les tranches cérébrales de souris ont pu être maintenues pendant plus de 4 semaines en culture. L’analyse au microscope confocal a démontré que les tranches fixées avaient environ 100 µm d’épaisseur. Les structures cérébrales, les vaisseaux sanguins et le réseau neuronal ont été préservés à J29. Les cellules de lignée issues de glioblastomes humain (GL15 et 8MG-BA), injectées dans les tranches, ont survécu et continué à exprimer l’antigène de surface HLA-ABC. L’analyse confocale a montré que la tumeur implantée grossissait dans la tranche cérébrale (Figure 11). Aucune gliose réactive n’a pu être observée autour de la masse tumorale après l’injection, les cellules tumorales se sont parfaitement intégrées dans le tissu hôte.

#### **Expression de la GFP dans les GL15.**

Un cycle unique d’exposition au surnageant viral a induit une infection de 98 % des GL15 qui ont pu être maintenue en culture pendant plus de 15 semaines et utilisées depuis 2 ans. La transduction s’est révélée efficace et stable comme illustré par l’intensité constante de fluorescence. Les GFP-GL15 ont présenté un phénotype stable et non modifié par rapport aux cellules natives. L’immunomarquage HLA et la prolifération ont été similaires.

#### **Comportement invasif des GL15 et 8MG-BA**

Le comportement invasif des GL15 et 8MG-BA a été différent. Les 8MG-BA se sont développées en formant une masse irrégulière, augmentant avec le temps, avec très peu de cellules en infiltration. De même, les cellules de rat C6 ont formé une grosse tumeur (environ de 800 µm de diamètre à J15) sans présenter d’infiltration dans le parenchyme. A l’opposé, les GL15 ont présenté un patron de croissance reproductible avec la formation d’une masse tumorale sphérique, et une augmentation du nombre de cellules en infiltration et en migration à distance de la masse (Figure 12).

La progression des cellules tumorales, quantifiée par la surface d’infiltration, le diamètre d’infiltration, la distance maximale et le nombre de cellules à plus de 500µm de la masse s’est révélée reproductible entre les différentes expériences à chaque temps. A J8, les GL15 ont formé une masse tumorale sphérique avec peu de cellules en infiltration dans le parenchyme hôte (surface d’infiltration -IS=73 10<sup>2</sup>  $\pm$  5 10<sup>2</sup> µm<sup>2</sup>, diamètre d’infiltration -ID=834 $\pm$ 33 µm) (Table 7). A J15, de nombreuses (100 < n < 500) GL15 en infiltration ont été observées dans toute la périphérie tumorale, et ces cellules envahissaient le parenchyme de façon diffuse. A J15, le diamètre de la zone d’infiltration (ID=1060 $\pm$ 38 µm) a aug-



menté significativement de 27% par rapport à J8 ( $p < 0.001$ ). A J29, le diamètre de la zone d'infiltration ( $ID = 1123 \pm 33 \mu m$ ) n'a pas changé significativement par rapport à J15, mais la densité cellulaire dans la masse tumorale a diminué au profit de la zone d'infiltration. En fait, les cellules s'infiltrant de plus en plus dans la marge tumorale, la limite de la masse tumorale s'est révélée de moins en moins visible. De J8 à J29, la surface occupée par les cellules tumorales dans la zone d'infiltration a augmenté de 93% ( $IS = 141 \cdot 10^2 \pm 13 \cdot 10^2 \mu m^2$  à J29) ( $p < 0.001$ ).

Les cellules de la lignée GL15 greffées dans l'épaisseur des tranches cérébrales ont envahi progressivement la marge tumorale, puis ont migré le long des vaisseaux sanguins à une distance considérable de la masse tumorale (Figure 13). Des GL15 bipolaires étaient orientées en parallèle aux vaisseaux sanguins. Les cellules étaient en contact étroit avec la laminine de leur membrane basale, comme démontré par analyse confocale. La moyenne de la distance maximale de migration ( $465 \pm 50 \mu m$  à J8,  $752 \pm 51 \mu m$  à J15,  $917 \pm 58 \mu m$  à J29) a augmenté significativement de 62% entre J8 et J15 ( $p < 0.01$ ) et de 22% entre J15 et J29 ( $p < 0.05$ ). La distance maximale de migration observée sur la membrane basale des vaisseaux de l'espace sous-arachnoïdien a été de 3 mm. Le nombre de GL15 ayant migré à plus de  $500 \mu m$  de la masse tumorale ( $0.5 \pm 0.2$  à J8,  $5.3 \pm 2$  à J15,  $9.7 \pm 2$  à J29) a augmenté significativement de J8 à J15 ( $p < 0.05$ ) et de J8 à J29 ( $p < 0.001$ ). Peu de cellules GL15 ont été observées dans le corps calleux, et à une distance relativement courte. Aucune cellule n'a été observée à plus de  $500 \mu m$  de la masse tumorale (Figure 14). L'analyse confocale a démontré l'absence de contact entre les GL15 et les fibres myélinisées.

## Morphologie cellulaire

Corrélées à ces comportements invasif différents, les deux lignées humaines ont montré des morphologies variées. A l'opposé des 8MG-BA non invasives, qui restaient sphériques et présentaient des prolongements très courts et peu nombreux, les GL15 de la zone d'infiltration présentaient une morphologie bipolaire. De plus, les GL15 immobiles, présentes dans la masse tumorale, restaient sphériques avec des prolongements fins et courts même à J29 (Figure 15). Le ratio "diamètre nucléaire maximum/diamètre minimum" était significativement différent dans la masse tumorale ( $1.4 \pm 0.5$ ) et dans la zone d'infiltration ( $2 \pm 0.5$ ) ( $p < 0.001$ ), démontrant un allongement de noyau avec la migration. La morphologie des GL15 en invasion ne dépendait pas du temps étudié mais plutôt de la localisation des cellules tumorales. Les GL15 infiltrées dans la marge tumorale (d'une longueur de  $371 \pm 15 \mu m$ ) et le corps calleux ( $338 \pm 19 \mu m$ ) étaient bipolaires avec des prolongements en forme de flèche. Les GL15 présentes sur les vaisseaux sanguins

étaient aussi bipolaires et possédaient des prolongements plus long ( $416 \pm 15 \mu m$ ) que ceux des cellules le long des fibres myélinisées ( $p < 0.01$ ) ou dans la zone d'infiltration ( $p < 0.05$ ).

## Angiogenèse

L'évaluation de l'angiogenèse en périphérie de la masse tumorale a porté sur la densité des vaisseaux (évaluée par un pourcentage de surface occupée) et par l'orientation de ces vaisseaux par rapport à la tumeur. Quelque soit le temps étudié la marge des 8MG-BA ne présentait pas de différence de densité de vaisseaux par rapport à une zone témoin prise à la même profondeur du cortex mais à distance de la masse tumorale. La densité des vaisseaux s'est révélée plus que deux fois supérieure à J29 dans les tranches injectées avec des GL15 que dans celles implantées avec des 8MG-BA ( $p < 0.02$ ). A J8, J15 et J29, le 25 percentile et la médiane de l'angle des vaisseaux par rapport à la tangente de la tumeur était significativement supérieur (plus proche de  $90^\circ$  donc dirigé vers le centre de la tumeur) pour les GL15 que pour les 8MG-BA (Table 8, Figure 17).

## Double injection de GL15

Les deux lignées GL15 injectées ont été reconnues par l'anticorps dirigé contre l'antigène HLA ABC. Nous avons distingué les deux séries de cellules tumorales grâce à l'utilisation d'une lignée GL15 GFP et d'une lignée GL15 non GFP. L'injection en premier de GL15 GFP nous a permis de vérifier que la seconde injection pouvait techniquement être effectuée au niveau de cette tumeur primaire. En effet, à J16, le lendemain de la seconde injection, on observait une zone non fluorescente au niveau de la première tumeur, correspondant au deuxième site d'injection de cellules non GFP. Pour la suite de l'étude, nous avons greffé des GL15, puis à J15 des GL15 GFP. L'analyse au microscope confocal a montré que les deux séries de cellules tumorales se développaient dans l'épaisseur de la tranche. A J29, 15 jours après la deuxième injection, on observait les GL15 GFP injectées secondairement regroupées en amas en périphérie de la tumeur primaire, au niveau de la zone d'infiltration (Figure 18). Ces amas secondaires étaient composés de cellules GL15 GFP bipolaires orientées tangentiellement par rapport à la tumeur initiale formée de GL15 non GFP. Au centre de la première tumeur, une zone de dégénérescence de cellules GL15 GFP était présente. L'observation au microscope confocal a cependant démontré l'existence de quelques cellules GFP intactes mélangées aux cellules de la première tumeur, sans séparation nette des deux types de cellules tumorales. Dans tous les cas, on a systématiquement retrouvé des cellules de la seconde injection qui s'infiltraient parallèlement aux cellules de la

première (Figure 19). Les deux séries de cellules tumorales se mélangaient et on observait des contacts physiques entre les différentes cellules. Au microscope confocal, on a pu constater que les GL15 et les GL15 GFP s'infiltraient dans le même plan. Des cellules GL15 étaient parfois alignées à des cellules GL15 GFP, les cellules de la seconde injection précédant les GL15 en migration. Enfin on a pu observer des cellules tumorales des deux injections alignées les unes derrière les autres sur un vaisseau de l'espace sous-arachnoïdien (Figure 20).

## Irradiation

L'irradiation des cellules en culture a induit une forte diminution de la prolifération illustrée par le taux de renouvellement des cellules. Le temps moyen pour le premier repiquage après irradiation était de 15 jours contre 3 chez les témoins. Dans les tranches cérébrales, les cellules irradiées formaient une tumeur de surface significativement inférieure aux témoins (moins 29,8% à J15 et moins 42,2% à J29). L'aspect et l'évolution de la tumeur étaient similaires aux cellules non irradiées. On a observé notamment une surface d'infiltration proportionnellement identique (entre 29,9% et 42,2% de la surface totale selon le temps chez les témoins et les irradiées). Le nombre de cellules MIB1 positives, rapporté ou non à la surface de la tumeur était significativement diminué pour les cellules irradiées (Table 9).

## 4- Discussion

Les cellules tumorales GL15 injectées et maintenues pendant quatre semaines en culture de tranche reproduisent les caractéristiques générales de l'invasion cérébrale observées *in vivo* dans les gliomes. Les GL15 montrent une invasion progressive de la marge tumorale, une dissémination de cellules individuelles sur de longues distances en contact étroit avec la membrane basale des vaisseaux, et une invasion limitée du corps calleux. De façon opposée aux GL15 rondes et faiblement ramifiées de la masse tumorale et aux 8MG-BA, les GL15 invasives démontrent une morphologie bipolaire et de longs prolongements très fins. Dans cette étude, nous décrivons un modèle quantifiable et reproductible d'infiltration de cellules de gliome dans le cerveau à l'aide de cultures de tranches cérébrales de rongeur et de cellules de gliome humain. Nous y démontrons que des cellules tumorales réinjectées dans une tumeur déjà formée, suivent les voies de migration empruntées par les cellules de la première tumeur.

## Un nouveau modèle d'invasion de glioblastome

Si le taux de prolifération peut maintenant être quantifié par analyse histopathologique de biopsie (Rooprai *et al*, 1997), l'invasion n'est pas vraiment quantifiable. Nous avons établi un système *in vitro* permettant une analyse de cette caractéristique primordiale des gliomes en utilisant des cultures organotypiques de tranches cérébrales dans lesquelles des cellules tumorales humaines ont été implantées, et se sont développées pendant quatre semaines. De plus ce modèle pourrait améliorer la culture des tumeurs cérébrales humaines qui restent difficiles à mettre en œuvre. L'implantation de cellules issues de biopsie de glioblastome pourrait apporter une évaluation précoce des capacités invasives, ce qui pourrait aider le neurochirurgien à mettre en place une stratégie thérapeutique adaptée.

Les études *in vitro* utilisant les molécules purifiées de la matrice extracellulaire, ont suggéré que certains substrats de la matrice, les intégrines et les systèmes protéolytiques, pouvaient être préférentiellement impliqués dans l'adhésion, l'infiltration, et la migration des glioblastomes (Giese *et al*, 1994; Friedlander *et al*, 1996; Tamaki *et al*, 1997). Pourtant, les expériences *in vitro* et même les modèles tridimensionnels plus complexes comme la reconstitution de membrane basale (De Hauwer *et al*, 1997) ou les agrégats fœtaux (Knott *et al*, 1998), sont inaptes à simuler les interactions complexes entre les cellules tumorales et l'environnement hôte (Giese et Wesphal, 1996; Pilkington *et al*, 1997). Les modèles *in vivo* apportent des données sur les mécanismes d'invasion, mais sont difficiles et coûteux à utiliser. Les cultures de tranches cérébrales combinent les avantages d'un modèle de glioblastome tridimensionnel avec une architecture cérébrale conservée (Gähwiler *et al*, 1997) et ceux issus de la possibilité de modifier les paramètres d'invasion et d'observer la morphologie cellulaire comme dans des expériences *in vitro*. Récemment, Ohnishi *et al* (1998) ont étudié la réponse de sphéroïdes de glioblastome à des chimioattractants dans un modèle de tranche cérébrale. Dans cette étude, nous démontrons que le comportement invasif de deux lignées humaines correspond à celui observé dans un modèle de xénogreffe intracérébrale chez le rat. Ce comportement invasif contraste avec celui des lignées de glioblastomes les plus couramment utilisées, i.e. les cellules de rat C6 (Benda *et al*, 1968) et 9L (Weizsaecker *et al*, 1981) qui ont été produites par application *in vivo* de carcinogènes. Avec peu d'exceptions (Bernstein et Woodard, 1995; Chicoine et Silbergeld, 1995b; Hensel *et al*, 1998), ces cellules et certaines lignées humaines (Engelbraaten *et al*, 1999), progressent plus par expansion que par infiltration (Peterson *et al*, 1994) lorsqu'elles sont implantées dans le cerveau de rat.



Figure 11. Croissance tumorale dans les trois dimensions et intégration dans le tissu hôte.

(a) Analyse confocale du marquage de la GFAP (Cy3-rouge) et des GL15 transduites avec le gène de la protéine fluorescente verte (GFP, vert) à J8. L'analyse confocale montre la tumeur dans l'épaisseur de la tranche, le marquage GFAP indiquant la partie supérieure et inférieure de la tranche (x10). (b) Double immunomarquage pour HLA-ABC (Cy3-rouge) et GFAP (FITC-vert) à J8. Les cellules tumorales se mélangent avec les astrocytes de la tranche cérébrale qui possèdent un phénotype quiescent. (x20), barre : 100  $\mu$ m.

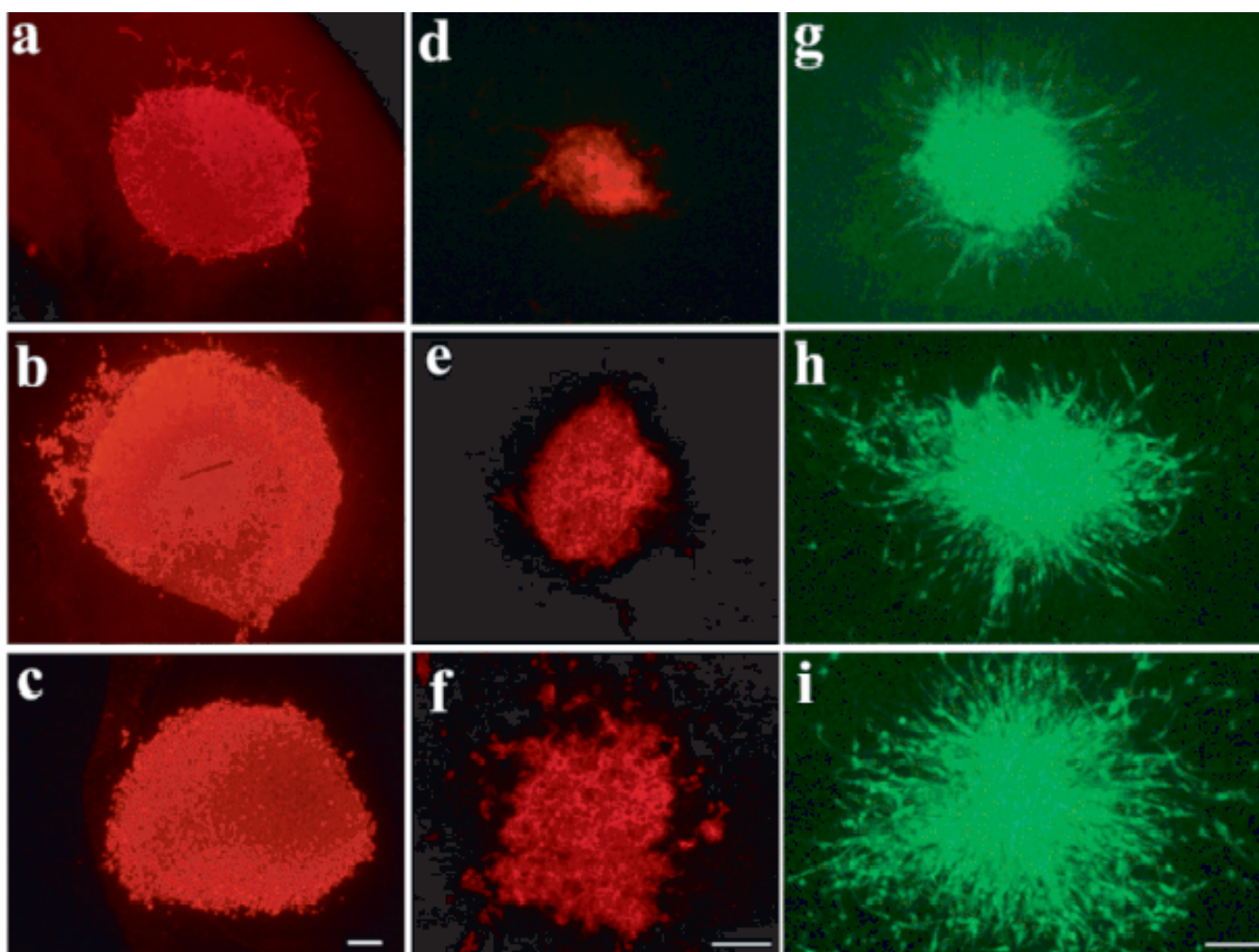
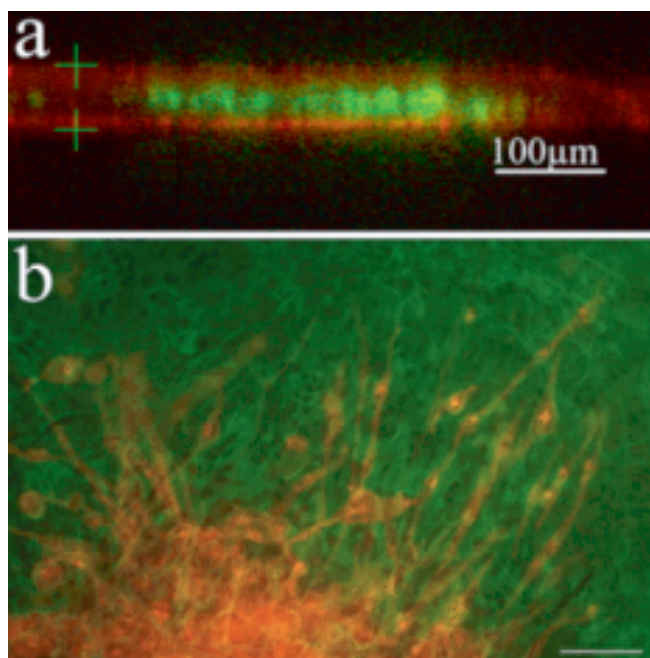


Figure 12 : Croissance tumorale des C6 (a, b, c), 8-MG-BA (d, e, f) et GFP-GL15 (g, h, i) à J8, J15 et J29.

(a, b, c) Immunomarquage HLA-ABC. Les C6 forment une tumeur sphérique de grand diamètre sans infiltration apparente même à J29. (d, e, f) Immunomarquage HLA-ABC. Les 8-MG-BA se développent comme des tumeurs irrégulières avec très peu de cellules en infiltration. (g) A J8, les cellules GFP-GL15 (vert) forment une tumeur dense sphérique avec peu de cellules infiltrantes. (h) A J15, de nombreuses cellules GL15 infiltrent le parenchyme dans toute la périphérie tumorale, la limite de la masse tumorale initiale est toujours observable. (i) A J29, noter l'infiltration péri-tumorale massive. Barre = 200  $\mu$ m.

Temps	LD $\mu\text{m}$	IS $10^3/\mu\text{m}^2$	Dmax $\mu\text{m}$	N
D8	834 $\pm$ 33	73 $\pm$ 5	470 $\pm$ 50	0.5 $\pm$ 0.2
D15	1060 $\pm$ 38	107 $\pm$ 21	750 $\pm$ 51	5.3 $\pm$ 2.0
D29	1123 $\pm$ 33	141 $\pm$ 13	920 $\pm$ 58	9.7 $\pm$ 2.0

Table 7. Mesure du comportement invasif des GL15.

Les valeurs de la table correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM. (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

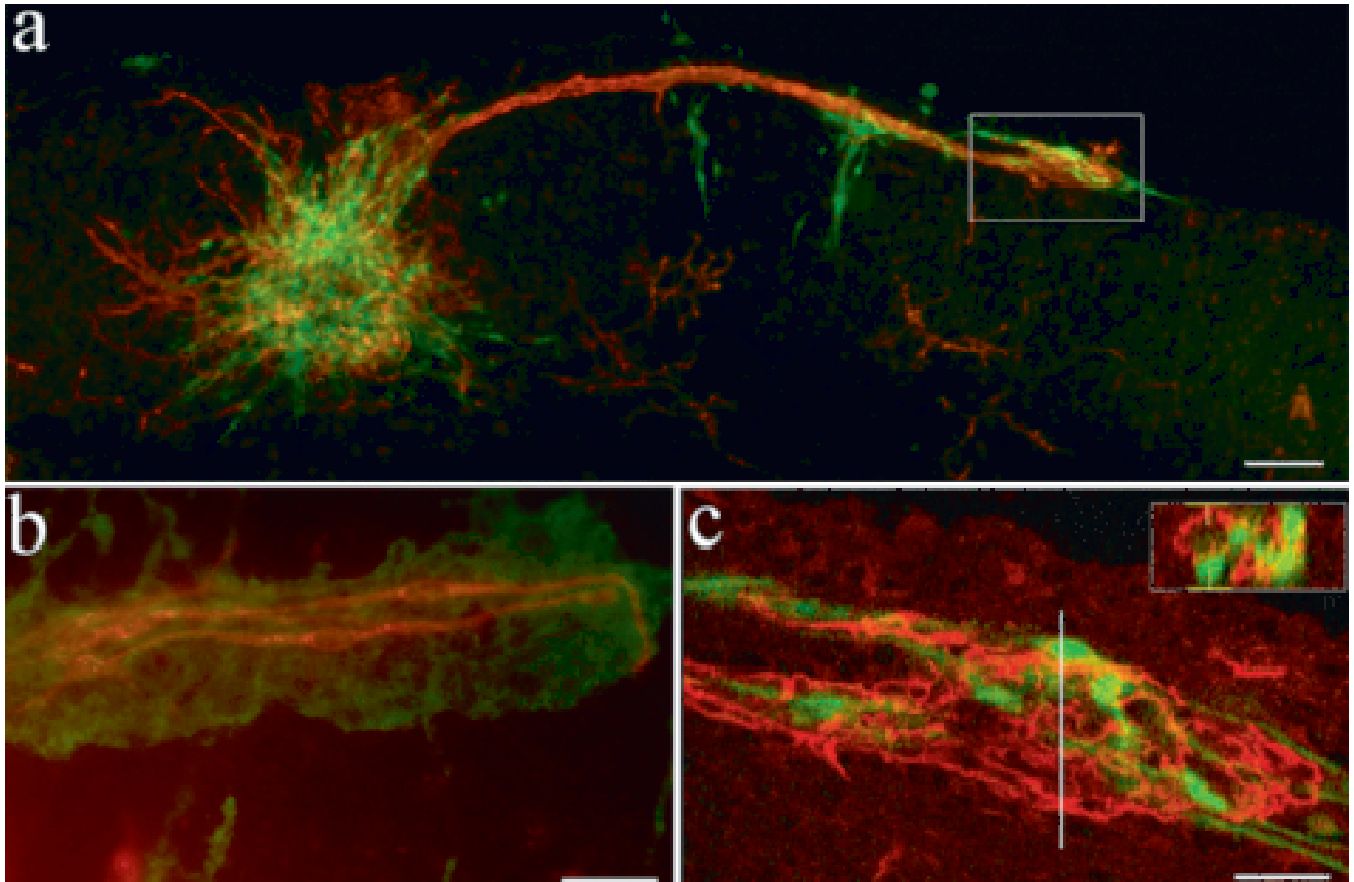
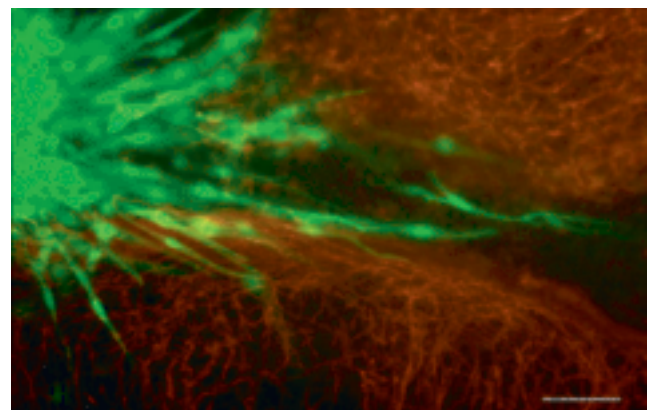


Figure 13. Comportement invasif des GL15 sur les vaisseaux sanguins.

(a) Immunomarquage Laminine (Cy3-rouge) et cellules GL15-GFP (vert) à J29 montrant la migration des cellules le long des vaisseaux de l'espace sous-arachnoïdien. Le vaisseau est relié à la surface tumorale. Des cellules GL15 bipolaires migrent le long de ce vaisseau. La cellule la plus éloignée est à plus de 2 mm de la masse tumorale (x10), barre : 200  $\mu\text{m}$ . (b) Double immunomarquage HLA-ABC (Cy3-rouge) et laminine (FITC-vert) à J29. Les cellules tumorales, qui suivent l'orientation du vaisseau, ont une morphologie bipolaire avec de très longs prolongements. A l'extrémité du vaisseau, le prolongement cellulaire change d'orientation. (x40), barre : 50  $\mu\text{m}$ . (c) L'analyse confocale de la zone encadrée dans (a) montre des cellules tumorales bipolaires en contact étroit avec la laminine de la membrane basale des vaisseaux. La zone insérée correspond à la section perpendiculaire et montre que les cellules tumorales sont entourées par la membrane basale. Barre = 50  $\mu\text{m}$

Figure 14. Migration des GL15 dans le corps calleux.

Immunomarquage MBP (Cy3-rouge) et GL15-GFP (vert) à J15. La tumeur est localisée entre le cortex et le corps calleux visualisé par de nombreuses fibres immunoréactives pour la MBP et organisées en faisceaux. Des cellules tumorales perdent contact avec la masse et migrent dans le corps calleux dans une zone sans marquage MBP. Ces cellules possèdent une morphologie bipolaire avec des prolongements pointus. Barre = 100  $\mu\text{m}$ .





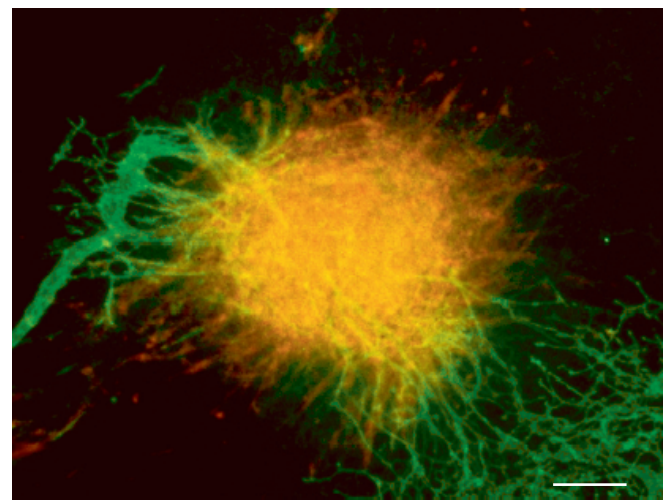
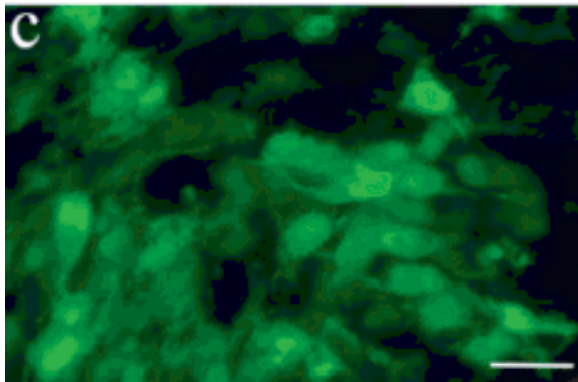
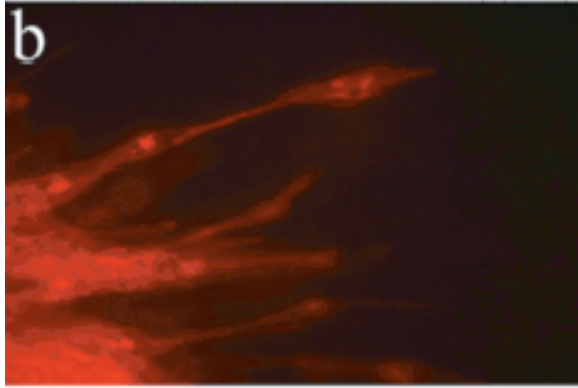
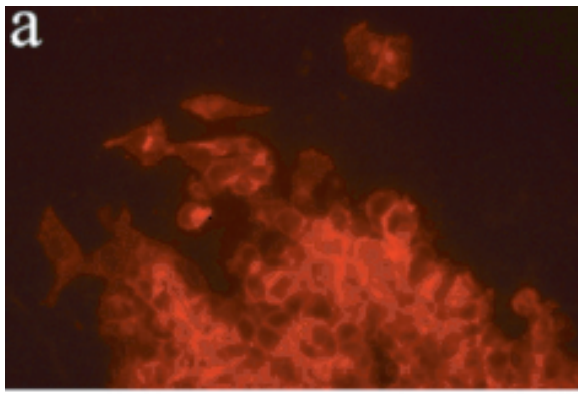


Figure 16. Angiogenèse autour de la tumeur GL15. Immunomarquage laminine (FITC) et HLA-ABC (CY3) dans une tranche cérébrale injectée avec des GL15 à J29. Barre = 150µm.

Figure 15. Morphologie des 8-MG-BA et des GL15 dans les tranches cérébrales.

(a) Immunomarquage HLA-ABC à J15. Les 8-MG-BA ont une morphologie sphérique aussi bien dans la masse tumorale que dans la zone d'infiltration. (b) Immunomarquage HLA-ABC à J15. Les GL15, qui infiltrent le parenchyme, ont une morphologie bipolaire avec des prolongements allongés. (c) GL15-GFP sur une coupe de 10 µm d'épaisseur à J8. Les GL15-GFP de la masse tumorale sont sphériques avec quelques prolongements fins et courts. Noter l'absence de cellules bipolaires. Barre = 50 µm.

	J8		J15		J29	
	GL15	8 MG	GL15	8 MG	GL15	8 MG
P25	0,61 ± 0,11	0,40 ± 0,07	0,53 ± 0,05	0,34 ± 0,07	0,56 ± 0,11	0,36 ± 0,04
P50	0,85 ± 0,04	0,73 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,74 ± 0,10	0,83 ± 0,05	0,71 ± 0,11

Table 8. Orientation des vaisseaux par rapport à la tumeur. Médiane et 25 percentile des sinus des angles formés par les vaisseaux par rapport à la tangente de la tumeur à J8, J15, J29.

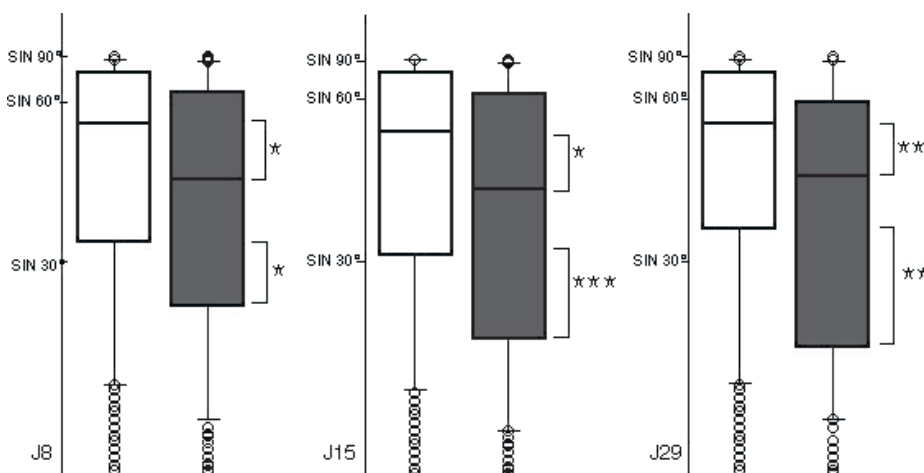


Figure 17. Représentation schématique de l'orientation des vaisseaux par rapport à la tumeur.

GL15 en blanc, 8MG en gris. Sinus des angles formés par les vaisseaux par rapport à la tangente de la tumeur à J8, J15, J29. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

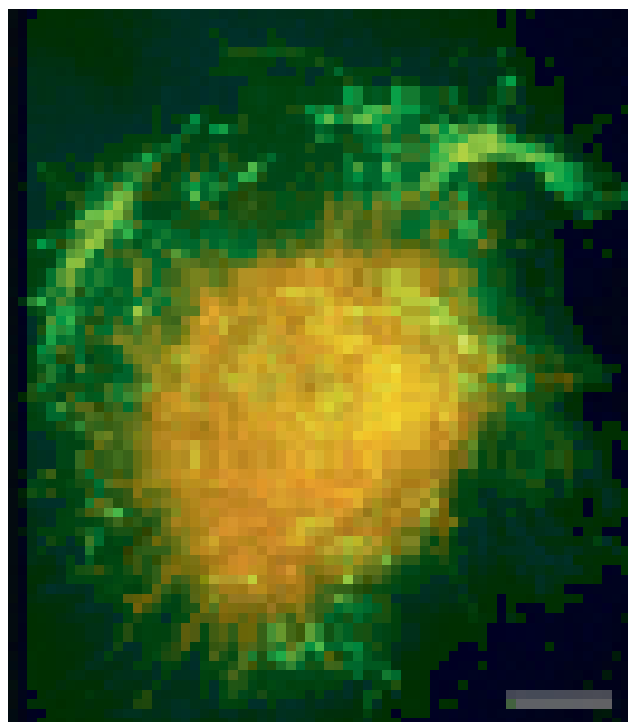


Figure 18. Double injection de GL15 dans les tranches cérébrales à J18. Immunomarquage HLA-ABC (Cy3, rouge) et GL15-GFP (vert). Barre = 150  $\mu$ m.

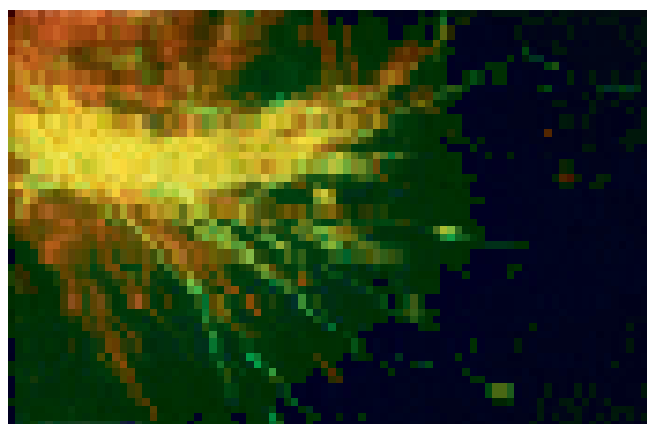


Figure 19. Double injection de GL15 dans les tranches cérébrales à J22. Immunomarquage HLA-ABC (Cy3, rouge) et GL15-GFP (vert). Barre = 100  $\mu$ m.

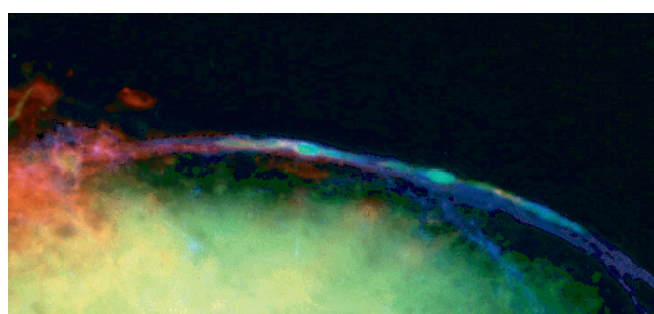


Figure 20. Double injection de GL15 dans les tranches cérébrales à J29. Immunomarquage HLA-ABC (Cy3, rouge), laminine (bleu) et GL15-GFP (vert). Barre = 100  $\mu$ m.

	J15				J29			
	třmoin	±	irradiře	±	třmoin	±	irradiře	±
surface totale (pixels)	587682	153212	412578	107545	448021	63902	311012	98139
% surface infiltration	42,2	9,8	29,9	13,5	37,4	4,6	36	14,2
nb ř MIB	66,8	51,1	6,3	6,5	90,8	54,2	4	4,3
nb ř MIB/100000 px	10,82	7,56	1,41	1,19	20,79	12,03	1,47	1,5

Table 9. Effet de l'irradiation sur les tumeurs GL15 dans les tranches cérébrales.



De même, dans les tranches cérébrales, seules les GL15 implantées dans l'épaisseur développent une masse tumorale et reproduisent les voies d'invasions de glioblastomes observées *in vivo*. Les phénomènes d'infiltrations y sont reproductibles et quantifiables. De plus, notre modèle est potentiellement utile pour étudier le comportement d'invasion dans les différents compartiments du cerveau. En particulier, le réseau vasculaire conservé dans les tranches offre la possibilité d'étudier la migration le long des vaisseaux en l'absence de flux de liquide céphalo-rachidien.

### Comportement invasif des GL15

Le comportement invasif est en partie le résultat d'interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules tumorales. Le comportement hétérogène de nos deux lignées de glioblastome humain, dans les tranches cérébrales pourrait ne pas être dû à des grades différents, mais pourrait refléter différents niveaux de mobilité constitutive et/ou des différences de spécificité pour certains ligands (Friedlander *et al*, 1996; Giese et Wesphal, 1996). Cette différence peut aussi être imputée à des expressions variées de métalloprotéinases par les cellules tumorales ou par des dépôts de matrice extracellulaire qui créent un environnement plus ou moins permissif (Edwards et Murphy, 1998). Seules les GL15 montrent une invasion progressive de la marge tumorale, et une dissémination sur de longues distances de cellules individuelles. L'infiltration locale de la marge tumorale est une composante connue de la progression des glioblastomes humains (Scherer, 1940; Burger *et al*, 1988). Une invasion limitée du corps calleux par les GL15 a été observée et seulement dans des zones non myélinisées. Ce résultat semble en désaccord avec la capacité connue des cellules de glioblastome à utiliser les trajets des fibres de la substance blanche comme voie majeure de dissémination (Scherer, 1940; Burger *et al*, 1988; Bernstein *et al*, 1989a; Pedersen *et al*, 1993; Pedersen *et al*, 1995; Nagashima *et al*, 1999). Le déplacement sur de longues distances des cellules de glioblastome dans la substance blanche a été alternativement attribué à des liaisons spécifiques à des ligands (Giese *et al*, 1996a), et à un déplacement passif dans les plans de moindre résistance (Pedersen *et al*, 1995; Bernstein, 1996; ). *In vitro*, la myéline purifiée issue de cerveau humain a été identifiée comme un substrat permissif pour l'adhésion et la migration (Giese *et al*, 1996a). Il a été aussi démontré que la migration préférentielle des gliomes de haut grade sur la myéline impliquait une métalloprotéase liée à la membrane (MT1-MMP) nécessaire pour dépasser les inhibiteurs de l'adhésion cellulaire (Amberger *et al*, 1998; Beliën *et al*, 1999; Hensel *et al*, 1998). Puisque le corps calleux de rongeurs de 7 jours utilisé pour nos tranches cérébrales n'est pas complètement myélinisé, l'invasion

minimale des GL15 pourrait être expliquée par l'absence de myéline permissive, et la présence documentée de constituants de la matrice extracellulaire empêchant l'adhésion (Giese *et al*, 1996a). Pourtant les xénogreffes de GL15 dans le cerveau de rat montrent une infiltration massive dans le corps calleux, ainsi il est concevable que le manque de contact direct entre les cellules tumorales et les fibres myélinisées puisse expliquer l'incapacité des GL15 à envahir le corps calleux des tranches cérébrales. A côté de cette infiltration massive et de l'invasion minimale du corps calleux, des cellules individuelles ou des séries alignées de GL15 ont été régulièrement observées sur les parois vasculaires, et à une distance progressivement de plus en plus élevée de la masse tumorale. Les expériences sur rongeurs ont montré que les cellules de gliome C6 adhèrent aux couches de laminine de la membrane basale (Bernstein et Woodard, 1995), processus qui semble impliquer les intégrines  $\beta 1$  (Paulus *et al*, 1996), et la formation d'hémidesmosomes (Nagano *et al*, 1993). Nos données sur les GL15 en migration, retrouvées systématiquement adhérentes à la laminine de la membrane basale, suggèrent fortement que les cellules de glioblastome humain peuvent migrer de façon similaire sur la membrane basale grâce à des contacts spécifiques avec de récepteurs. Les sous-unités des intégrines  $\alpha 3$ ,  $\alpha V$  et  $\beta 1$  sont par ailleurs exprimées par les gliomes (Paulus *et al*, 1993), et *in vitro*, les cellules de gliome humain migrent préférentiellement sur les substrats purifiés de membrane basale comme la laminine et le collagène IV (Giese *et al*, 1994; Giese *et al*, 1995; Mahesparan *et al*, 1997). Une controverse persiste pour savoir si le déplacement des cellules de gliome dans l'espace péri-vasculaire met en jeu une migration, une pression croissante ou un transport par le liquide céphalo-rachidien (Pedersen *et al*, 1994; Pedersen *et al*, 1995; Bernstein, 1996; Giese et Wesphal, 1996). La culture de tranches cérébrales offre la possibilité unique de documenter la dispersion des cellules de gliome en absence de flux de LCR. Nous n'observons pas de cellule tumorale GL15 ou 8MG-BA dans les vaisseaux sous arachnoïdiens ou sous piaux, ce qui est loin d'être rare dans les gliomes humains (Higuchi *et al*, 1995). Nos travaux suggèrent que le déplacement périvasculaire des cellules de gliome pourraient faire intervenir deux mécanismes différents : une migration active de cellules individuelles étroitement liées à la membrane basale des vaisseaux, et un déplacement passif de cellules tumorales détachées dépendant du flux de LCR.

### Les capacités d'invasion sont associées à la morphologie cellulaire

Les cellules GL15 expriment probablement de façon différentielle des 8-MG-BA, des intégrines qui permettent des interactions avec la matrice

extracellulaire, entraînant une activation du cytosquelette et ainsi une mobilité cellulaire. L'expression de la GFP permet de montrer que les GL15 en migration sont bipolaires avec des prolongements longs et fins à l'opposé des GL15 de la masse et de la plupart des 8MG-BA qui sont rondes et peu ramifiées. Cette morphologie bipolaire semble refléter une activation de cytosquelette indispensable au phénotype invasif (Chicoine et Silbergeld, 1995a; Gillespie *et al*, 1999). Cette activation pourrait résulter de la liaison à des intégrines, différemment exprimées par les cellules de gliome (Knott *et al*, 1998; Tonn *et al*, 1998). *In vitro*, les liaisons avec les substrats de la MEC comme la laminine ou le collagène IV sont connus pour conférer une morphologie bipolaire aux cellules de gliome en migration (Friedlander *et al*, 1996). Cette activation du cytosquelette pourrait être responsable des morphologies variées des GL15 en infiltration dans la marge tumorale, en migration dans le corps calleux ou le long des vaisseaux. Les GL15 sur la membrane basale des vaisseaux sont les cellules les plus allongées et celles qui migrent le plus loin. Ces résultats suggèrent aussi que les mécanismes de déplacement des cellules dépendent du substrat puisque l'espace extracellulaire de la membrane basale des vaisseaux et celui des axones myélinisés est profondément différent (Giese et Wesphal, 1996). Pourtant, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que les GL15 bipolaires puissent former une sous population de GL15 et que leur morphologie bipolaire leur confère la capacité d'envahir et de migrer sur des ligands spécifiques.

Les GL15 injectées dans les tranches cérébrales fournissent un modèle parfaitement reproductible de glioblastome humain aussi bien pour la croissance tumorale et pour la morphologie des cellules tumorales, que pour le comportement sur différents substrats. Dans ce modèle, nous observons que deux lignées de glioblastomes humains présentent de fortes différences de comportement d'invasion. L'invasion semble suivre des voies spécifiques le long des vaisseaux sanguins. La capacité d'invasion dans le cerveau hôte est associée à la morphologie des cellules tumorales. Ce modèle semble être adapté pour l'évaluation comparative des capacités d'invasion d'une tumeur individuelle. Cette évaluation devant reproduire les caractéristiques observées *in vivo*, les cultures de tranches cérébrales sont potentiellement utiles pour les études sur les mécanismes d'invasion et sur les thérapeutiques ciblant la migration cellulaire. De plus, les tranches cérébrales offrent la possibilité unique d'observer la migration active sur la laminine. A l'opposé, les modèles *in vivo* donnent des résultats contradictoires sur la migration le long des vaisseaux à cause de la circulation, de l'apport de sang à la tumeur, et de la circulation des lymphocytes qui peuvent altérer la survie ou la migration des cellules tumorales. En conséquence, notre modèle ne peut être utilisé ni pour l'étude de la nutrition

tumorale, ni pour les stratégies d'immunothérapie. Un inconvénient supplémentaire réside dans le faible déplacement des cellules tumorales le long du corps calleux, qui peut refléter soit une absence du déplacement passif observé *in vivo* dans les voies de moindre résistance, soit une différence entre les résultats dans la tranche et ceux *in vivo* en raison de la présence des molécules différentes intervenant dans la migration cellulaire.

## Angiogenèse et migration tumorale

Dans notre modèle, les tranches injectées avec des GL15 présentent une modification de l'organisation vasculaire. L'augmentation de densité et la réorientation des vaisseaux à proximité de la tumeur correspondent à des étapes connues de l'angiogenèse tumorale. Un des critères de diagnostic du glioblastome est la présence d'une néoangiogenèse au sein de la tumeur (Damas-Duport *et al*, 1988). En effet, le développement d'un réseau vasculaire est essentiel à la croissance tumorale (Folkman *et al*, 1987). Les cellules tumorales contrôlent ce phénomène en diminuant la synthèse des inhibiteurs ou en augmentant celle des effecteurs de l'angiogenèse. Le facteur angiogénique principal est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), sensible en particulier à l'ischémie observée dans la tumeur. Il a été décrit une surexpression du VEGF et de ses récepteurs R1 et R2 par les cellules tumorales de glioblastome et également par les cellules gliales au cours du développement (Plate *et al*, 1995). De nombreuses recherches tendent à neutraliser les effets du VEGF en utilisant des anticorps bloquant le VEGF (Kim *et al*, 1993), en diminuant sa synthèse via l'administration d'oligonucléotides antisens (Cheng *et al*, 1996) ou en augmentant l'expression d'une forme soluble du VEGFR (Goldman *et al*, 1998). Dans tous les cas, on observe une diminution de la croissance tumorale. Des expériences préliminaires montrent dans notre modèle une expression du VEGF par une sous population astrocytaires, plutôt à proximité de la tumeur et une expression du VEGF par les GL15 observée en Western blotting. Notre modèle expérimental de culture organotypique, s'il conserve les vaisseaux même à 4 semaines, est caractérisé par une absence de circulation sanguine. L'angiogenèse observée ne peut donc avoir de rapport avec la nutrition de la tumeur. En revanche, il serait pertinent de profiter de ce système pour évaluer l'implication de cette angiogenèse pour la migration tumorale en dehors de tout effet parasite sur la croissance par l'apport sanguin.

Une seconde série de cellules tumorales, réinjectées dans le site d'injection primaire, présente les mêmes profils d'invasion que dans la phase initiale. Le comportement des cellules tumorales injectées secondairement confirme l'existence de voies de migration préférentielles. Les cellules tumorales pourraient être utilisées comme vecteur d'un agent thérapeutique pour assurer son accès aux cellules tumorales infiltrées. Après injection d'une seconde série de cellules tumorales, nous avons observé la formation d'amas secondaires orientés tangentiellement par rapport à la tumeur initiale. Cette disposition de la seconde série de cellules tumorales dans la zone d'infiltration de la tumeur primaire est probablement due à une compétition importante au centre de la première tumeur. D'autres cellules de la seconde injection s'infiltrèrent parallèlement aux cellules de la première série, les rejoignent et se mélangent avec elles. *In vivo*, chez la souris, des cellules tumorales modifiées pour produire un rétrovirus contenant le gène TK, injectées 3 jours après l'injection de la première série de cellules tumorales, sont retrouvées en migration le long des mêmes voies de migration que dans la phase initiale (Tamura *et al*, 1998). Elles provoquent une disparition efficace des cellules tumorales infiltrées. La thérapie génique offre des perspectives encourageantes pour le traitement des glioblastomes. Mais, s'il y a bien destruction du foyer tumoral après injection de fibroblastes libérant des rétrovirus contenant le gène suicide TK ou directement des rétrovirus, les cellules infiltrées ne sont pas accessibles aux vecteurs viraux et sont responsables de la récurrence tumorale (Giese et Westphal, 1996). L'effet de voisinage observé dans l'utilisation du gène TK assure la destruction d'une dizaine de cellules proches de la cellule infectée. La toxicité est limitée et nécessite la contamination virale de l'ensemble des zones contenant des cellules tumorales. L'utilisation de cellules modifiées pour synthétiser et libérer une cytokine immunostimulante pourrait déclencher une réaction immunitaire locale provoquant la destruction des cellules tumorales sur un plus large périmètre. Les cellules productrices doivent être capables de migrer et de rejoindre les cellules infiltrées pour assurer l'accès thérapeutique à l'ensemble de la tumeur. Ce n'est pas le cas des fibroblastes qui sont les plus utilisés en thérapie génique et cellulaire (Tamura *et al*, 1997). Il faut également que la migration des cellules utilisées s'effectue selon les mêmes voies de migration préférentielles caractéristiques des cellules tumorales de glioblastome. Les cellules tumorales remplissent ces différents critères. En résumé, l'irradiation des GL15 en culture avant implantation dans les tranches a permis de diviser par 10 la prolifération dans les tranches sans modifier les capacités d'infiltration et de migration des cellules tumorales.

### 1- Biopsie par stéréotaxie assistée par tomодensitométrie des tumeurs du système nerveux central chez le chien

#### Justification

Une concordance entre les gliomes canins et humains est observée dans les données épidémiologiques, cliniques, et histologiques (en particulier le caractère infiltrant non observé dans les modèles d'implantation de lignées tumorales chez le rat). Parmi les tumeurs du SNC chez le chien, les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus répandues (incidence de 14/100 000). Une forte prédominance des races dérivées du bulldog ancestral (boxer, boston terrier, bulldog, etc...) est à signaler dans l'espèce canine. Il n'existe aucune différence significative d'incidence entre mâle et femelle. La thérapie classique est proche de celle utilisée chez l'homme (exérèse, chimiothérapie, radiothérapie). Les données concernant la survie des animaux opérés de tumeurs cérébrales sont peu nombreuses et le résultat à long terme dépend pour l'essentiel du type de tumeur opérée. Le pronostic est amélioré par la chirurgie de façon significative, mais reste mauvais (2 à 3 mois pour les gliomes sans traitement, contre 2 à 6 mois avec traitement, données personnelles, P. Moissonnier).

La nécessité de posséder un bilan d'extension d'un cancer avant d'aborder son traitement chirurgical s'est imposée comme une règle fondamentale de l'oncologie. Cette démarche générale n'était pas appliquée en neurochirurgie centrale vétérinaire pour plusieurs raisons. En l'absence de technique d'imagerie médicale accessible au praticien vétérinaire autorisant l'évaluation des formations intracrâniennes, le diagnostic clinique était trop imprécis pour entreprendre une intervention chirurgicale. La gravité potentielle de certaines tumeurs du système nerveux central conduisait rapidement à une euthanasie des chiens. L'évolution des techniques d'imagerie (tomodensitométrie, IRM), leur accessibilité aux praticiens vétérinaires, et les progrès simultanés réalisés en chirurgie neurologique permettent à présent d'aborder les tumeurs du cerveau comme tout autre néoplasme. Malgré les progrès de l'imagerie médicale, il n'est pas toujours possible d'établir avec certitude la nature histologique de la tumeur. Certaines lésions "inflammatoires" (prise de contraste) ou supposées "dégénératives" (zones hypodenses) laissent souvent persister un doute quant à la nature exacte de l'affection causale. Le pronostic et le schéma thérapeutique demeurent ainsi difficiles à établir. La biopsie s'impose alors, l'application qui nous intéresse est le diagnostic anatomo-pathologique.



## Différents types de biopsie

- Biopsie par résection (Niebauer *et al*, 1991) : La tumeur est abordée dans son intégralité et un fragment est prélevé en vue d'examen. Cette modalité est trop complexe pour être proposée comme préalable à la chirurgie et ne s'applique qu'aux cas où l'exérèse est en première intention ayant été prévue, elle s'avère trop délabrante.
- Biopsie à main levée (Harari *et al*, 1993) : L'aspect volumineux des tumeurs intracrâniennes lors du diagnostic tomодensitométrique laisse parfois espérer qu'un simple repérage par mesure externe à partir des formations anatomiques directement palpables est suffisant pour en prélever un fragment. L'épaisseur des muscles recouvrant les zones de biopsie, la faible taille relative des tumeurs (une masse de 2cm de diamètre paraît volumineuse au scanner mais correspond à un petit volume rapporté au crâne), l'absence de rapports constants entre les repères crâniens externes et les formations cérébrales, rendent cette technique très aléatoire en pratique.
- Biopsie échoguidée (Benediktsson *et al*, 1992) : Le besoin de voir la zone biopsiée a conduit à développer cette technique. Moyennant la conception d'un viseur s'adaptant au trou de trépan, la précision de la biopsie est bonne. Mais la technique se heurte en pratique vétérinaire à la présence de formations anatomiques denses (faux du cerveau et tente du cervelet), à la nécessité de posséder une sonde et un gel stériles, d'adapter un trocard de Sedan sur l'instrumentation et d'appliquer l'ensemble sans occasionner de lésions au cortex cérébral par compression.
- Biopsie par stéréotaxie assistée par TDM : Nous nous sommes orientés depuis plusieurs années vers cette modalité qui, associe une grande innocuité pour le patient à une précision de l'ordre du millimètre une fois l'instrumentation adaptée aux chiens et chats.  
Il s'agit de repérer un point ou cible dans le cerveau et d'y amener avec précision et innocuité un instrument de biopsie. Chez l'animal d'expérimentation, comme chez l'homme, des atlas de stéréotaxie fournissent les coordonnées spatiales des différentes formations anatomiques de l'encéphale. La diversité des formats rencontrés en clinique ne permet pas d'utiliser ces atlas et un repérage individuel (par TDM) est indispensable (Apuzzo *et al*, 1983). Un cadre de stéréotaxie modulable et compatible avec son passage au scanner, inspiré de celui employé chez l'homme (cadre de Laitinen) et s'appuyant sur les conduits auditifs, la bouche et le palais a été conçu. Ce cadre comporte des repères qui, retranscrits sur l'image TDM, permettent de localiser la cible dans l'espace. Nous nous sommes fixé une cible de 1 cm de diamètre comme objectif, compte tenu de nos constatations cliniques concernant la taille des tumeurs habituellement rencontrées.

## Matériels et méthodes

Description du cadre (Figure 21).

Nous avons mis au point un cadre permettant de produire, sur les clichés tomодensitométriques, des points de repère extra-crâniens utilisables pour calculer les coordonnées spatiales d'un point intracrânien. Tous les matériaux utilisés sont rigides et compatibles avec le scanner. Le cadre est modifiable à volonté selon le format du chien. Il autorise une contention reproductible au scanner et lors de la biopsie. Il est composé d'un support et de montants, de triangles de localisation assurant les repères extra-crâniens, d'un fantôme de visée qui permet de réaliser une simulation de biopsie après retrait du chien hors du cadre, d'une perche de biopsie guidant le trocard jusqu'au point matérialisé par le fantôme de visée et correspondant aux coordonnées spatiales du centre de la cible, de barres d'oreilles et constricteur nasal assurant l'immobilisation stricte de la tête. Le biopseur à guillotine à ouverture latérale est muni de trois tiges coaxiales (type Sedan) dont l'extrémité mousse permet une pénétration atraumatique au sein des formations normales.

La procédure de biopsie par stéréotaxie est un geste chirurgical réalisé au bloc opératoire en s'entourant de toutes les mesures accompagnant une intervention intracrânienne (anesthésie, asepsie, matériel ...). On peut retenir les temps principaux suivants : mise en place du cadre adaptation au patient (Figure 22), réalisation d'un scanner (Figure 23), calcul des coordonnées, repérage de la cible au moyen du "fantôme", préparation du patient dans la cadre au bloc opératoire, craniotomie au trépan débrayable, biopsie de la cible, obstruction de l'orifice et fermeture des plaies.

La biopsie est un geste invasif intracrânien qui réclame une surveillance post-opératoire de 48 heures environ même si la plupart des patients regagnent les locaux d'hospitalisation en laisse dès le réveil.

## Utilisation en clinique

L'évaluation de la précision a été réalisée par injection d'une pâte radio-opaque sur têtes de cadavres et d'un second scanner pour comparer les coordonnées des cibles théoriques et réelles. La précision moyenne a été de  $2,9 \pm 1,1$  mm ce qui assure la possibilité de biopser des masses de 6 mm.

Cette technique a été appliquée en clinique sur 23 chiens ayant subi un scanner ne permettant pas de conclure sur la pathologie cérébrale.

Le tissu cible n'a pas été atteint dans un seul cas en raison de la rigidité de la tumeur (ménin-giome). Sur les 22 cas restant, le diagnostic a pu être réalisé dans 21 cas (5 oligodendrogliomes, 3 astrocytomes, 1 gliome mixte, 5 méningiomes, 3 lymphomes, 1 papillome de plexus choroïde, 1 carcinome de cellule squameuse, 1 méningo-



encéphalite granulomateuse, 1 encéphalite). Des complications légères ont été observées dans 4 cas. Deux chiens sont morts après la biopsie. Le nombre élevé de complications et la gravité dans deux cas en comparaison des résultats obtenus chez l'homme peuvent être associés à des hémorragies. La gravité de ces hémorragies, même minimes peut être expliquée par le diagnostic tardif associé à une forte hypertension préopératoire chez le chien, ainsi qu'à l'absence d'angiographie.

## **2- Culture de biopsies de glioblastomes**

### **Matériels et méthodes**

Des fragments issus de 3 biopsies (2 astrocytomes anaplasique et 1 oligo-astrocytome mixte) de tumeurs canines ont été mis en culture. Les prélèvements ont été déposés juste après la biopsie dans du milieu Leibowitz (Gibco) additionné de 100 µg mL<sup>-1</sup> de streptomycine, 100U mL<sup>-1</sup> de pénicilline, puis transportés au laboratoire et conservés à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à leur utilisation. L'ensemble des étapes ultérieures a été réalisé en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical. La dissection a été effectuée dans le milieu Leibowitz additionné des antibiotiques : les parties nécrosées et hémorragiques ont été retirées. Après deux rinçages avec la solution saline de Hanks, la tumeur a été découpée en morceaux d'environ 0,1 mm<sup>3</sup>. Les morceaux ont été mis en culture dans des boîtes de pétri contenant 500µL du milieu de culture suivant : DMEM, 20% SVF, 2mM glutamine, 100µg mL<sup>-1</sup> streptomycine, 100U mL<sup>-1</sup> pénicilline, 2% acides aminés, 5µg mL<sup>-1</sup> insuline. Le milieu a été changé au bout d'une semaine puis deux fois par semaine (1 mL par boîte). Après 2 à 3 semaines de culture, les explants ont été retirés et les cellules qui ont adhéré ont été repiquées. Après deux rinçages avec la solution saline de Hanks, les cellules ont été décollées par la trypsine EDTA 0,05% à 37°C pendant 2 à 5 min, l'action de la trypsine a été stoppée par l'addition de milieu contenant du SVF, puis la solution a été centrifugées 10 mn à 300g. Le culot obtenu a été repris dans du milieu et remis en culture. Pour la greffe dans les tranches, le protocole suivi a été identique à celui des lignées.

### **Résultats**

Seule la technique de mise en culture de morceau de 0,1 mm<sup>3</sup> sans dissociation enzymatique ou mécanique a pu aboutir à une multiplication cellulaire. Progressivement des cellules sont sorties des morceaux et ont adhéré à la boîte de pétri, puis se sont étalées tout autour des morceaux. La plupart ont formé des clones. La morphologie cellulaire à la sortie des morceaux a varié en

fonction des cas. On a observé des cellules bipolaires fusiformes orientées de façon centrifuge par rapport au morceau, des cellules différenciées avec des prolongements fins, et des cellules présentant un corps cellulaire étalé.

Les cellules qui avaient colonisé environ 50% de la boîte ont été repiquées après trypsination. Pour les deux astrocytomes, les cellules se sont détachées facilement et ont adhéré à nouveau dans une boîte neuve, et se sont multipliées à nouveau pendant 2 à 4 passages. Dans le cas de la tumeur mixte, les cellules n'ont pas pu être détachées.

Le premier cas d'astrocytome a été injecté après 4 passages alors que les cellules ne se multipliaient presque plus. L'autre cas d'astrocytome a été injecté dans les tranches après le deuxième repiquage.

En culture, les cellules issues de biopsie ont été identifiées par la vimentine (Figure 24), tandis qu'elles étaient faiblement marquées par la fibronectine et la GFAP. Dans les tranches, on a visualisé les cellules tumorales par un marquage vimentine. Les cellules issues du premier astrocytome canin, injectées dans les tranches, formaient une petite tumeur sphérique, compacte. Il n'y avait pas d'infiltration, on observait cependant la présence de quelques cellules tumorales à distance du foyer tumoral qui, la plupart du temps, étaient associées à des dépôts de laminine.

Les cellules du second astrocytome se sont développées sous forme d'une masse tumorale, avec, dès J8, de nombreuses cellules présentant de très longs prolongements fins en infiltration dans toutes les directions. A J15 la masse tumorale présentait en son centre une zone de légère nécrose, le nombre de cellules en infiltration était fortement augmenté, la morphologie cellulaire était exacerbée avec des prolongements qui dépassant 50 µM, et des corps cellulaires très peu visibles (Figure 25). Il ne semblait pas y avoir de rapport entre les vaisseaux présents autour de la masse tumorale et l'infiltration des cellules tumorales. En revanche, dans deux tranches, nous avons observé un vaisseau qui pénétrait dans la masse tumorale et entourait la partie nécrotique.

### **Discussion**

La culture de cellules tumorales issues de biopsie ou d'exérèse s'est révélée fastidieuse et aléatoire, même si le taux de réussite a été meilleur que dans les cultures de glioblastomes humains. Pour ces derniers, nous avons adopté une autre technique basée sur l'injection dans les tranches cérébrales, non pas de cellules dissociées issues d'une culture mais de morceaux directement obtenues à partir de la biopsie. Ce choix annule un temps de culture long et aléatoire (contamination, absence de croissance), et évite de travailler sur des clones sélectionnés par la culture.

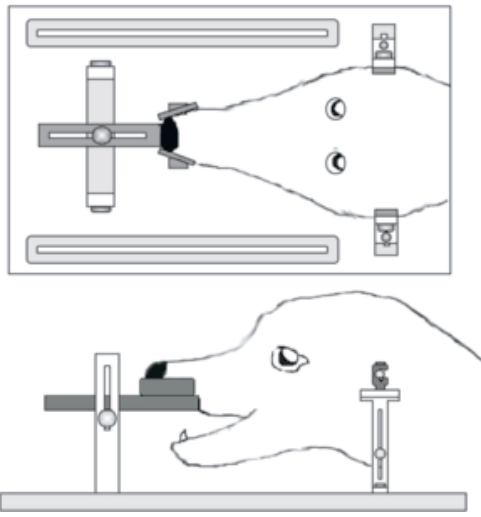


Figure 21. Représentation schématique du cadre stéréotaxique.



Figure 22. Chien mis en place dans le cadre stéréotaxique.

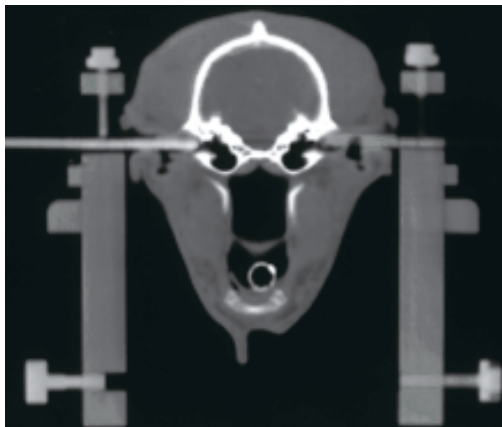


Figure 23. Scanner du chien avec le cadre stéréotaxique.

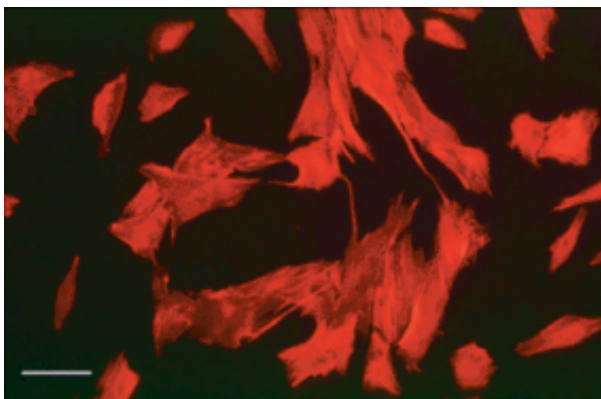


Figure 24. Astrocytome anaplasique canin en culture. Immunomarquage Vimentine des cellules tumorales en culture. Barre = 80  $\mu$ m.

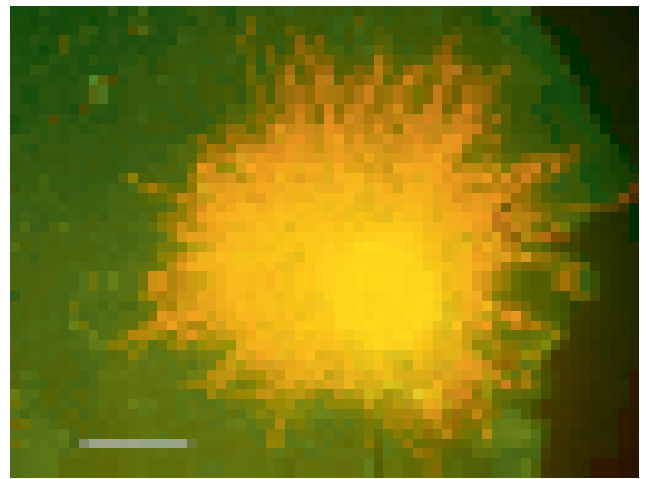


Figure 25 : Astrocytome canin dans une tranche cérébrale de souris.

Double immunomarquage vimentine (Cy3-rouge) et laminine (FITC-vert) des tranches cérébrales à J15 injectée avec des cellules d'astrocytome anaplasique de chien. Barre = 300  $\mu$ m

## D. Perspectives

### 1- Evolution du protocole de double injection

Un certain nombre de résultats ont été obtenus et permettent de continuer le projet de thérapie cellulaire et génique des glioblastomes. Dans les modèles de tranches cérébrales et de rats immunodéprimés greffés avec des cellules d'une lignée tumorales, nous avons caractérisé des voies de migration préférentielles et stéréotypées reproduisant celles observées chez les patients (infiltration de proximité, migration le long des vaisseaux et dans la substance blanche). Dans les tranches cérébrales, les cellules de la seconde tumeur se sont développées en périphérie de la première et ont emprunté les mêmes voies de migration. Parallèlement nous avons démontré la faisabilité d'une irradiation de ces cellules afin de diminuer fortement leur pouvoir prolifératif tout en conservant leur caractère infiltrant. La double injection en utilisant les cellules irradiées a reproduit les résultats de suivi des voies de migration observé avec des cellules non irradiées. Dans le protocole de double injection intracérébrale chez le rat immunodéprimé, nous n'avons pas pu démontrer le suivi des voies de migration de la seconde tumeur.

La faisabilité du protocole clinique sur le chien a pu être démontrée par un recrutement de tumeurs cérébrales à l'école vétérinaire, par la réalisation de biopsies stéréotaxiques chez le chien grâce à la mise au point un cadre stéréotaxique adapté et utilisable sous scanner, et par la culture *in vitro* des cellules de glioblastome et leur injection dans les tranches cérébrales. La suite de ces travaux correspond à la construction d'un vecteur de

thérapie génique afin de modifier *ex vivo* les cellules tumorales prélevées chez le Chien en introduisant un gène codant pour une cytokine immunostimulante (GM-CSF ou IL2) canine sous dépendance d'un promoteur inducible, et associé au gène TK pour pouvoir détruire les cellules par administration de Ganciclovir.

Alternativement, les cellules souches ont montré des capacités migratoires élevées. Etant plus facilement accessibles et cultivables que les cellules tumorales elles pourraient être utilisées comme vecteur.

Les travaux expérimentaux développés à partir de nos deux modèles de glioblastome invasif ont été à l'origine d'études plus larges sur ces glioblastomes et sur les moyens thérapeutiques envisageable :

## **2- Modification de l'angiogénèse**

Le modèle de tranches cérébrales injectées avec des cellules tumorales s'est révélé être un modèle original d'angiogénèse excluant le rôle nourricier de l'angiogénèse pour la tumeur mais permettant d'étudier spécifiquement l'interaction entre vaisseaux néoformés et migration cellulaire. La quantification d'une angiogénèse dépendant de la lignée tumorale injectée nous assure un modèle adéquat pour l'évaluation de toute modification de cette angiogénèse. Nous commençons en collaboration un travail visant à inhiber cette angiogénèse dans les tranches par la transfection d'un gène codant pour l'angiotatine ou l'endostatine afin d'observer les conséquences sur la migration cellulaire et la croissance tumorale.

De manière générale, ce modèle semble bien adapté à l'étude des interactions entre cellule tumorale et cellule hôte.

## **3- Evaluation de la sensibilité chimiothérapique des glioblastomes dans les tranches cérébrales**

Les deux modèles établis reproduisent fidèlement le comportement des glioblastomes chez les patients. Nous allons donc les utiliser pour tester différentes thérapeutiques ciblées contre la prolifération cellulaire et l'angiogénèse. Une première évaluation de l'efficacité thérapeutique de différentes molécules en cours d'essais précliniques, ou en développement, sera réalisée sur différentes lignées cérébrales (GL15, 8MG-BA et lignée établies chez des souris nude à l'IGR) dans le modèle de tranches cérébrales plus facile à mettre en œuvre. L'effet des molécules présentant les actions les plus sensibles pourra être évalué dans le modèle de xénogreffe intracérébrale. L'objectif est de réaliser une évaluation individuelle du comportement des cellules tumorales d'un patient en réponse à ces molécules afin d'aider au choix thérapeutique. Les molécules concernées

dans un premier temps sont le Thalidomide pour ses effets démontrés sur l'angiogénèse et la croissance tumorale, et d'autres molécules utilisées parallèlement en essai clinique de phase 1 à l'IGR.

## **4- Caractérisation génétique des cellules invasives**

Ce modèle semble aussi adapté pour une étude de corrélation entre la clinique, le phénotype invasif et l'expression génique.

Bien que la capacité d'envahissement du parenchyme soit connue depuis longtemps (Scherer 1940) les connaissances sur le mécanisme et sur le phénotype invasif restent très partielles. De nombreuses études recherchent les mécanismes d'invasion, mais peu explorent la nature des cellules invasives. Il a été suggéré que les cellules invasives pourraient posséder des propriétés différentes des cellules de la masse tumorale (Chicoine et Silbergeld, 1995a). La plupart des gliomes, considérés comme ayant une origine clonale, présentent une instabilité génétique et développent des populations clonales distinctes. La PCR associée à une CGH sur 50-60 cellules a permis à Jung *et al* (1999) de démontrer des pertes et gains de régions spécifiques de chromosomes, indétectables dans l'homogénat tumoral. L'hétérogénéité au sein d'une tumeur est aussi mise en évidence par la mutation p53 (Louis, 1994; Kyritsis *et al*, 1996), par l'expression de PTEN (Sano *et al*, 1999) ou l'activation d'EGFR (Feldkamp *et al*, 1999). Ces cellules invasives ont été mises en évidence dans les études anatomo-pathologiques (Scherer *et al*, 1940; Nagashima *et al*, 1999) et dans des modèles rongeurs utilisant des cellules tumorales prémarquées (Lampson *et al*, 1992; Paulus *et al*, 1996). Ces cellules invasives semblent toujours résister aux thérapeutiques lors de destruction du foyer tumoral ou lors d'arrêt de la prolifération cellulaire (Terzis *et al*, 1993). Les récurrences apparaissent systématiquement à partir de la zone d'infiltration (Lee *et al*, 1999). De plus, les cellules invasives ne semblent que rarement développer une seconde masse tumorale (Rogers *et al*, 1994). Il a donc été spéculé que les cellules invasives supprimaient leur potentiel de prolifération mais étaient capables de le retrouver sous influence de facteurs inconnus probablement des facteurs de croissance et des molécules d'interaction de type intégrine (Chicoine et Silbergeld, 1995a,b; Giese et Westphal, 1996). Quelques hypothèses ont été soulevées pour expliquer le contrôle du cycle cellulaire dans les cellules en migration. Les études de migration *in vitro* ont montré que les cellules en migration rapide ne proliféraient pas temporairement (Giese *et al*, 1996b). Dans le cerveau humain, prolifération et migration ne sont ni corrélées ni exclusives (Schiffer *et al*, 1997).

La grande différence entre les cellules en invasion et les cellules de la masse tumorale est que

les premières se sont détachées de la masse et continuent à se déplacer en cellule individuelle. Le changement consécutif d'environnement implique nécessairement des changements drastiques de la balance prolifération/mort cellulaire. Dans des sphéroïdes de gliomes canins, il a été démontré que la quantité de gap junctions entre les cellules tumorales (illustrée par l'expression de la connexine 43) était corrélée négativement avec la migration, suggérant une facilitation de la migration par la perte de connexine 43 (McDonough *et al*, 1999). La suppression de connexine 43 a induit une augmentation de la croissance des C6. (Omori et Yamasaki 1998). Inversement les cellules de gliome possédant la connexine 43 peuvent établir des jonctions gap avec les astrocytes du parenchyme (Zhang *et al*, 1999). Il a de plus été montré que des cellules de gliome en coculture avec des cellules exprimant la connexine 43 présentaient une inhibition de leur croissance suggérant une influence des astrocytes sur les mitoses des cellules de gliome (Zhu *et al*, 1992).

Les facteurs de croissance et leurs récepteurs peuvent influencer différemment des cellules en infiltration peu nombreuses au regard des cellules du parenchyme et des cellules de la masse tumorale (Ness *et al*, 1994; El-Obeid *et al*, 1997). Parmi les facteurs de croissances associés à un effet positif sur la migration, on citera l'EGF, le basic fibroblast growth factor (bFGF) (Engelbraaten *et al*, 1993), et l'hépatocyte growth factor/scatter factor (SF) (Lattera *et al*, 1997). L'objectif du travail est de réaliser une analyse séparée du comportement d'invasion et de croissance des cellules isolées de la marge et de la masse tumorale de gliomes, et dans un second temps des propriétés biologiques qui sous-tendent ces comportements dans les tranches cérébrales. Dans ce but, deux biopsies stéréotaxiques seront obtenues, une dans la masse tumorale et une dans la marge. L'implantation des prélèvements sera réalisée dans les conditions déjà établies. Les paramètres évalués compareront quantitativement la prolifération et l'invasion, parallèlement à une étude génétique.



## Références

- Albert FK, Forsting M, Sartor K, Adams H-P, Kunze S. (1994) Early post operative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: Objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis. *Neurosurgery*; 24:45-61
- Amberger VR, Hensel T, Ogata N, Schwab ME (1998) Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin *in vitro* is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. *Cancer Research* 58 : 149-158.
- Andrews DW, Das R, Kim S, Zhang J, Curtis M (1997) Technetium MIB1 as a glioma imaging agent for the assessment of multidrug resistance. *Neurosurgery* 40 : 1323-1333.
- Apocada G, Rutka JT, Bouhana K, Berens ME, Giblin JR, Rosenblum ML, McKerrow JH, Banda MJ (1990) Expression of metalloproteinases and metalloproteinases inhibitors by fetal astrocytes and glioma cells. *Cancer Research* 50 : 2322-2329.
- Apuzzo MLJ, Sabshin JK (1983) Computed tomographic guidance stereotaxis in the management of intracranial mass lesions. *Neurosurgery*, 12, 277-285.
- Aspberg A, Miura R, Bourdoulous S, *et al* (1997) The C-type lectin domain of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci USA* ;94:10116-21
- Bauer B, Amsler-Delafosse S, Clausen P-H, Kabore I., Petrich-Bauer J (1995) Successful application of deltamethrin pour on to cattle in a campaign against tsetse flies in the pastoral zone of Samorogouan, Burkina Faso. *Tropical Medicine and Parasitology*, 46, 183-189.
- Beliën, A., Paganetti, P. and Schwab, M., Membrane-type 1 matrix metalloprotease (MT1-MMP) enables invasive migration of glioma cells in central nervous system white matter. *J. Cell. Biol.*, 144, 373-384 (1999).
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161 : 370-371.
- Benediktsson H, Andersson T, Sjölander U, Hartmann M, Lindgren PG (1992) Ultrasound guided needle biopsy of brain tumors using an automatic sampling instrument. *Acta Neurologica*, 33, 512-517.
- Bernard RO, Geddes JF (1987) The incidence of multifocal cerebral gliomas. A histologic study of large hemisphere sections. *Cancer* 60 : 1519-1531.
- Bernstein JJ (1996). Local invasion and intraparenchymal metastasis of astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22: 405-433.
- Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER Jr (1989a). Human malignant astrocytoma xenografts migrate in rat brains: a model for central nervous system cancer research. *J Neurosci Res* 22: 134-143.
- Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ER Jr (1989b). Immunohistochemistry of human malignant astrocytoma cells xenografted into rat brain: apolipoprotein E. *Neurosurgery* 68: 698-704.
- Bernstein JJ, Woodard CA (1995) Glioblastoma cells do not intravasate in to blood vessels. *Neurosurgery* 36 : 124-132.
- Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997). Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 94:303-9
- Bignami A, Hosley M, Dahl D. (1993) Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat. Embryol* :188:419-33
- Bigner SH, Batra SK, Rasheed BKA (1998). Cytogenetics, oncogenes and suppressor genes. In: Russel et Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System, Bigner D, McLendon RE, Bruner JM eds, Edward Arnold, London, Sydney, Auckland, 47-82.
- Bigner SH, Matthews MR, Rasheed BK, Wiltshire RN, Friedman HS, Friedman AH, Stenzel TT, Dawes DM, McLendon RE, Bigner DD (1999). Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155: 375-386.
- Bjerkvig R, Lund-Johansen M, Edvardsen K. (1997) Tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Curr Opin Oncol* ;9:223-29
- Black PML (1991a) Brain tumors. *N Engl J Med* 324 : 1471-1476.
- Black PML (1991b) Brain tumors. *N Engl J Med* 324 : 1555-1564.

- Bocchini V, Casalone R, Collilni P, Rebel G, Lo Curto F (1991) Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tiss Res* 265 : 73-81.
- Brüstle O, Ohgaki H, Schimtt HP, Walter GF, Ostertag H, Kleihues P (1992) Primitive neuroectodermal tumors after proliferative central nervous system irradiation in children : association with an activated K-ras gene. *Cancer* 69 : 2385-2392.
- Burger P, Dubois PJ, Clifford Schold S, Smith KR, Odom GL, Crafts DC, Giangaspero F (1983) Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 58 : 159-169.
- Burger P, Kleihues P (1989) Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implication for elevation of needle biopsy specimens. *Cancer* 63 : 2014-2023.
- Burger PC, Heinz ER, Shibata T, Kleihues P (1988). Topographic anatomy and CT correlations of the untreated glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 68: 698-704.
- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90: 1473-1479.
- Cheng SY, Huang HJS, Nagane M, Ji XD, Wang D, Shih CCY, Arap W, Huang CM, Cavenee WK (1996) Suppression of glioblastomas angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *PNAS* 93 : 8502-8507.
- Chicoine MR, Silbergeld DL (1995a). Assessment of brain tumor cell motility *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosurg* 82: 615-622.
- Chicoine MR, Silbergeld D (1995b). Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. *J Neurosurg* 1995 83: 665-671..
- Cohen-Haguenauer O, Restrepo L, Masset M, J, B, dal Cortivo L, Marolleau J, Benbunan M, Boiron M, Marty M. (1998) Efficient transduction of haemopoietic CD34+ progenitors of human origin using an original retrovirus vector derived from Fr-MuLV : *in vitro* assessment. *Hum. Gene Ther.*, 9: 207-215.
- Cosset F, Takeuchi Y, Battini J, Weiss R, Collins M. (1995) High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol.*, 69: 7430-7436.
- Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kelly PJ. (1987) A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas. *Mayo Clin Proc* ;62:435-49
- Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P (1988) Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 62 : 2152-2165.
- DeHauwer C, Camby I, Darro F, Decaestecker C, Gras T, Salmon I, Kiss R, VanHam P (1997) Dynamic characterization of glioblastoma cell motility. *Bioch Biophys Research Com* 232 : 267-272.
- De La Rocque S and Cuisance D (1997) Facteurs discriminants de la présence de glossines au Burkina faso. Intérêt dans la prévision du risque de trypanosomoses. *Epidémiologie et Santé animale*, 31-32.
- Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ (1993) Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. *J Neurosurg* 78 : 767-775.
- Edwards, D. and Murphy, G. (1988) Proteases-invasion and more. *Nature*, 394, 527-528.
- El-Obeid A, Bongcam-Rudloff E, Sorby M, Ostman A, Nister M, Westermarck B (1997). Cell scattering and migration induced by autocrine transforming growth factor alpha in human glioma cells *in vitro*. *Cancer Res* 57: 5598-5604.
- Emmet CJ, Lawrence JM, Raisman G, Seeley PJ. (1991) Cultured epithelioid astrocytes migrate after transplantation into the adult rat brain. *J Comp Neurol* ;310:330-41
- Engelbraaten O, Bjerkvig R, Pedersen PH, Laerum OD (1993). Effects of EGF, bFGF, NGF and PDGF (bb) on cell proliferative, migratory and invasive capacities of human brain-tumour biopsies *in vitro*. *Int J Cancer* 53: 209-214.
- Engelbraaten, O., Hjortland, G., Hirschberg, H. and Fodstad, O.(1999) Growth of precultured human glioma specimens in nude rat brain. *J. Neurosurg.*, 90, 125-132.
- Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A (1999). Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery* 45:1442-1453.
- Fine HA (1994). The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J Neuro-Oncol* 20: 111-120.
- Finkelstein SD, Black P, Nowak TP, Hand CM, Christensen S, Finch PW. (1994) Histological characteristics and expression of acidic and basic fibroblast growth factor genes in intracerebral xenogeneic transplants of human glioma cells. *Neurosurgery* ;34:136-43

- Folkman J, Klagsbrun M (1987) Angiogenic factors. *Science* 235 : 442-447.
- Friedlander DR, Zagzag D, Schiff B, et al (1996) Migration of brain tumor cells on extracellular matrix protein *in vitro* correlates with tumor type and grade and involves  $\alpha_v$  and  $\beta_1$  integrins. *Cancer Res* ;56:1939-47
- Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Oghaki P (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80: 65-72.
- Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures : a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20 : 471-477.
- Galanis E, Buckner J, Kimmel D, Jenkins R, Alderete B, O'Fallon J, Wang CH, Scheithauer BW, James CD (1998). Gene amplification as a prognostic factor in primary and secondary high-grade malignant gliomas. *Int J Oncol* 13: 717-724.
- Giese A, Westphal M (1996) Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39 : 235-252.
- Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME (1994) Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Research* 54 : 3897-3904.
- Giese A, Loo MA, Rief MD, Tran N, Berens ME. (1995) Substrates for astrocytoma invasion. *Neurosurgery* ;37:294-302
- Giese A, Kluwe L, Laube B, Meissner H, Berens ME, Westphal M (1996a) Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery* 38 : 755-764.
- Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME (1996b). Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer* 67: 275-282.
- Gillespie, G., Soroceanu, L., Manning, T., Gladson, C. and Rosenfeld, S. (1999) Glioma migration can be blocked by non-toxic inhibitors of myosin II. *Cancer Res.*, 59, 2076-2082.
- Gladson CL. (1999) The extracellular matrix of gliomas: Modulation of cell function. *J Neuropathol Exp Neurol* ;58:1029-40
- Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao X, Bett AJ, Huckle WR, Thomas KA, Curiel DT (1998) Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *PNAS* 95 : 8795-8800.
- Harari J, Moore MM, Leathers CW, Roberts GD, Gavin PR (1993) Computed tomographic-guided, free-hand needle biopsy of the brain tumors in dogs. *Progress in veterinary neurology*, 4, 41-44.
- Harley, J. M. B. et Wilson, A. J. (1968). Comparison between *Glossina morsitans*, *G. pallidipes* and *G. fuscipes* as vectors of trypanosomes of the *Trypanosoma congolense* group. *Annals of Tropical medicine and Parasitology*, 30, 178-187.
- Hensel T, Amberger VR, Schwab ME (1998) A metalloprotease activity from C6 glioma cells inactivates the myelin-associated neurite growth inhibitors and can be neutralized by antibodies. *Br J Cancer* 78 : 1564-1572.
- Higuchi, M., Arita, N., Ohnishi, T., Hiraga, S., Kusakabe, M., Sakakura, T. and Hayakawa, T (1995) Leptomeningeal dissemination of malignant glioma: immunohistochemical analysis of tenascin and glial acidic protein. *Clin. Neuropathol.*, 14, 223-227.
- Jacque C, Quinonero J, Collins PV, Villarroja H, Suard I. (1992) Comparative migration and development of astroglial and oligodendroglial cell populations from a brain xenograft. *J Neurosci* ;12:3098-106
- Jung V, Romeike BFM, Henn W, Feiden W, Moringlane JR, Zang KD, Urbach S (1999). *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 993-999.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Ferrara P et al (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. *Nature* 362 : 841-843.
- Klatzmann D, Valéry CA, Bensimon G, et al (1988) A phase I/II study of herpes simplex type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioma. Study group on gene therapy for glioblastoma. *Hum Gene Ther* ;9:2595-604
- Kleihues P, Oghaki H (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncology* 1: 44-51.
- Kleihues P, Scheithauer BW, Burger P (1993). Histopathological typing of tumours of the central nervous system, World Health Organisation International Histological Classification of Tumours, 2<sup>nd</sup> edition, Springer Verlag: Berlin.
- Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW, Burger PC (1995) Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 15 : 211-221.
- Knott CA, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bolge Tysnes B, Edvardsen K, Ness GO, Mork S, Lund-Johansen M, Bjerkvig R (1998) Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer* 75 : 864-872.
- Kornblith PL, Walker M (1988) Chemotherapy for malignant gliomas. *J Neurosurg* 68 : 1-17.

- Kyritsis AP, Xu R, Bondy ML, Levin VA, Bruner JM (1996). Correlation of p53 immunoreactivity and sequencing in patients with gliomas. *Mol Carcinog* 15: 1-4.
- Lampson LA, Wen P, Roman VA, Morris JH, Sarid JA (1992). Disseminating tumor cells and their interactions with leukocytes visualized in the brain. *Cancer Res* 52: 1018-1025.
- Lattera J, Nam M, Rosen E, Rao JS, Lamszus K, Goldberg ID, Johnston P (1997a). Scatter factor/hepatocyte growth factor gene transfer enhances glioma growth and angiogenesis *in vivo*. *Lab Invest* 6: 565-577.
- Lee SW, Fraas BA, Marsh LH, Herbolt K, Gebarski SS, Martel MK, Radany EH, Lichter AS, Sandler HM (1999). Patterns of failure following high-dose 3-D conformal radiotherapy for high-grade astrocytomas: a quantitative dosimetric study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43: 79-88.
- Lichter T, Glick RP, Sung Kim T, Hand R, Cohen EP (1995) Prolonged survival of mice with glioma injected intracerebrally with double cytokine secreting cells. *J Neurosurg* 83 : 1038-1044.
- Louis DN (1994). The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 11-21.
- Louis DN (1997). A molecular model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol*: 7: 755-764.
- Mahesparan, R., Tysnes, B., Edvardsen, K., Haugeland, H., Cabrera, G., Lund-Johansen, M., Engebraaten, O. and Bjerkvig, R (1997) Role of high molecular weight extracellular matrix proteins in glioma invasion. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 23, 102-112
- Masake, R. A., Majiwa, P. A. O., Moloo, S. K., Makau, J. M., Njuguna, J. T., Maina, M., Kabata, J., ole-Moiyoi, O. K. et Nantulya, V. M. (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the Polymerase Chain Reaction. *Experimental Parasitology*, 85, 193-205.
- Masiga, D. K., Smyth, A. J., Hayes, P., Bromidge, T. J. et GIBSON, W. C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal of Parasitology*, 22, 909-918.
- McDonough WS, Johansson A, Joffe H, Giese A, Berens ME (1999). Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int J Dev Neurosci* 17: 601-611.
- Mesnil M, Piccoli C, Tinaby G, Willecke K, Yamasashi H (1996) Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *PNAS USA* 93 : 1831-1835.
- Nagano, N., Sasaki, H., Aoyaki, K. and Hirakawa, K. (1993) Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol.*, 86, 117-125.
- Nagashima G, Suzuki R, Koaku H, Takahashi M, Miyo T, Asai J, Nakagawa N, Fujimoto T (1999). Graphic analysis of microscopic brain infiltration, proliferative potential, and vasculat endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. *Surg Neurol* 51: 292-299.
- Ness GO, Pedersen PH, Bjerkvig R, Laerum OD, Lillehaug JR (1994). Three-dimensional growth of glial cell lines affects growth factor and growth factor receptor mRNA levels. *Exp Cell Res* 194: 433-436.
- Niebauer GM, Habill MV, Dayrell-Dayrell BL, Speciale J (1991) Evaluation of craniotomy in dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 198, 898-95.
- Ohgaki H, Fujisawa H, Nakamura M, Yang F, Collela S, Reis RM, Kleihues P (2000). Loss of heterozygosity on chromosomes 10, 19 and 13q in primary and secondary glioblastomas. *Proc Am Assoc Cancer Res* 41: 629 (Abstract).
- Ohnishi T, Matsumara H, Izumoto S, Hiraga S, Hayakawa T (1998) A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Research* 58 : 2935-2940.
- Okoye GS, Powell EM, Geller HM. (1995) Migration of A7 immortalized astrocytic cells grafted into the adult rat stium. *J Comp Neurol* ;362:524-34
- Omori Y, Yamasaki H (1998). Mutated connexin43 proteins inhibit rat glioma cell growth suppression mediated by wild-type connexin43 in a dominant-negative manner. *Int J Cancer* 1998 78(4): 446-453.
- Owens, G., Orr, E., Demasters, B., Muschel, R., Berens, M. and Kruse, C. (1988) Overexpression of a transmembrane isoform of neural cell adhesion molecule alters the invasiveness of rat cns-1 glioma. *Cancer Res.*, 58, 2020-2028
- Paulus W et Tonn JC (1994) Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. *J Neurosurg* 80 : 515-519.
- Paulus, W., Barr, I. and Schuppan, D (1993) Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *Am. J. Pathol.*, 143, 154-163.
- Paulus W, Baur AS, Beutler AS, Reeves SA (1996). Diffus brain invasion of glioma cells requires beta1 integrins. *Lab Invest* 75: 819-826.



- Pedersen PH, Marienhagen K, Mork S, Bjerkvig R (1993) Migratory pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in the adult rat brain. *Cancer Research* 53 : 5158-5165.
- Pedersen, P., Rucklidge, G., Mork, S., Terzis, A., Engebraaten, O., Lund-Johansen, M., Backlund, E., Laerum, O. and Bjerkvig, R (1994) Leptomeningeal tissue: a barrier against brain tumor cell invasion. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 1593-1599.
- Pedersen PH, Edvardsen K, Garcia Cabrera I, Mahesparan R, Thorsen J, Mathisen B, Rosenblum ML, Bjerkvig R (1995) Migratory patterns of lac-z transfected human glioma cells in the rat brain. *Int J Cancer* 62 : 767-771.
- Perzelova, A., Macikova, I., Mraz, P., Bizik, I. and Steno, J. (1988) Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. *Neoplasma*, 45, 25-29.
- Peterson DL, Sheridan PJ, Brown WE. (1994) Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *J Neurosurg.* ;80:865-76
- Pilkington, G., Bjerkvig, R., De Ridder, L. and Kaaijk, P. (1997) *In vitro* and *in vivo* models for the study of brain tumor invasion. *Anticancer Res.*, 17, 4107-4110.
- Plate KH, Risau W (1995) Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* 15 : 339-347.
- Quinonero J, Colin C, Villarroya H, Collins P, Jacque C. (1993) Migration pathways, differentiation and survival of macroglial cells from a xenograft implanted into the thalamus of newborn mice. *Int J Devl Neurosci* ;11:545-54,
- Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, *et al* (1997) Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* ;3:1354-61
- Reifenberg, J. M., Cuisance, D., Frézil, J. L., Cuny, G. et Duvallet, G. (1997). Comparison of the susceptibility of different *Glossina* species to simple and mixed infections with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Savannah and Riverine-forest types. *Medical and Veterinary Entomology*, 11, 246-252.
- Rogers LR, Weinstein MA, Estes ML, Cairncross JG, Strachan T (1994). Diffuse bilateral cerebral astrocytomas with atypical neuroimaging studies. *J Neurosurg* 81: 817-821.
- Rooprai HK, McCormick D (1997). Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review. *Anticancer Res* 17: 4151-4162.
- Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. (1988) The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems : structure and function. *J Neurosurg* ;69:155-70
- San-Galli F, Vrignaud P, Robert J, Coindre JM, Cohadon F (1989) Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in Wistar rats. *J Neurooncol* ;17:299-304
- Sano T, Lin H, Chen X, Langford LA, Koul D, Bondy ML, Hess KR, Myers JN, Hong YK, Yung WK, Steck PA (1999). Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res* 59: 1820-1824.
- Scherer HJ (1940) The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain* 63 : 1-35.
- Schiffer D, Cavalla P, Dutto A, Borsotti L (1997). Cell proliferation and invasion in malignant gliomas. *Anticancer Res* 17: 61-69.
- Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohaparta G, Hosek SM, Kimmel D, O'Fallon J, Yates A, Feuerstein BG, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB (1999). Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 18: 4144-4152.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37 : 173-182.
- Tamaki, M., McDonald, W., Amberger, V., Moore, E. and Del Maestro, R. (1997) Implantation of C6 astrocytoma spheroid into collagen type I gels: invasive, proliferative, and enzymatic characterizations. *J. Neurosurg.*, 87, 602-609
- Tamura M, Shimizu K, Yamada M, Miyao Y, Hayakawa T, Ikenaka K (1998) Targeted killing of migrating by injection of HTK-modified glioma cells. *Human Gene Therapy* 8 : 381-391.
- Tamura M, Ikenaka K, Tamura K, Yoshimatsu T, Miyao Y, Kishima H, Mabuchi E, Shimizu K (1998) Transduction of glioma cells using a high titer retroviral vector system and their subsequent migration in brain tumors. *Gene Therapy* 5 : 1698-1704.
- Terzis AJ, Fiskerstrand T, Refsum H, Ueland PM, Arnold H, Bjerkvig R (1993). Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to antifolate drugs. *Int J Cancer* 54: 112-118.
- Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*;57:684-9

- Tonn JC, Wunderlich S, Kerkau S, Klein CE, Roosen K (1998) Invasive behaviour of human gliomas is mediated by interindividually different integrin patterns. *Anticancer Research* 18 : 2599-2606.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res*;56: 150-153.
- Walker M, Alexander E, Hunt W, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA (1978) Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. *J Neurosurg* 49 : 333-343.
- Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997). Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 3:523-30
- Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, Kiessling M, Cremer T (1996). Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 13, 983-994.
- Weizsaecker M, Deen DF, Rosenblum ML, Hoshino T, Gutin PH, Barker M (1981) The 9L rat brain tumor : description and application of an animal model. *J Neurol* 224 : 183-192.
- Wolburg H, Risau W. (1995) Formation of the blood brain barrier. In : Kettenmann H, Ranson BR, eds. *Neuroglia*. New York : Oxford : 763-76
- Zhang W, Couldwell WT, Simard MF, Song H, Lin H-C J, Nedergaard M (1999). Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res* 59: 1994-2003.
- Zhu D, Kidder GM, Caveney S, Naus CC (1992). Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10218-10221.